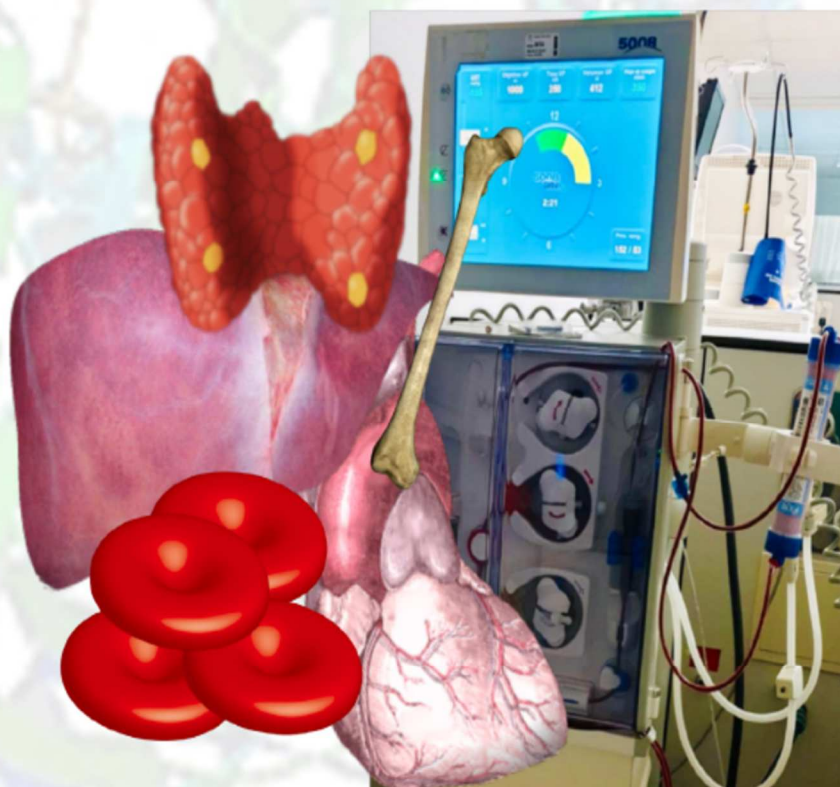


# HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO Y CAMBIOS DE FGF23 EN PACIENTES EN HEMODIÁLISIS



Autor:

**Cristian Roberto Rodelo Haad**

Directores:

Prof. Mariano Rodríguez Portillo

Prof. Alejandro Martín Malo

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

Fecha Depósito: 24/05/2019

TITULO: *HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO Y CAMBIOS DE FGF-23 EN  
PACIENTES EN HEMODIALISIS*

AUTOR: *Cristian Roberto Rodelo Haad*

---

© Edita: UCOPress. 2019  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---

# **HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO Y CAMBIOS DE FGF-23 EN PACIENTES EN HEMODIÁLISIS**

**AUTOR:** Cristian Roberto Rodelo Haad

**DIRECTORES:** Prof. Mariano Rodríguez Portillo y Prof. Alejandro Martín Malo

Programa de Doctorado en Biomedicina

IDEP Fecha de depósito: 24/05/2019







Departamento de Medicina, Dermatología y Otorrinolaringología

Universidad de Córdoba

## **HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO Y CAMBIOS DE FGF-23 EN PACIENTES EN HEMODIÁLISIS.**

Tesis Doctoral propuesta por Cristian Roberto Rodelo Haad, licenciado en Medicina, especialista en Nefrología, para optar al grado de Doctor.

### **Directores**

#### **Dr. Mariano Rodríguez Portillo**

Catedrático de Medicina

Departamento de Medicina, Dermatología y Otorrinolaringología

Universidad de Córdoba

#### **Dr. Alejandro Martín Malo**

Catedrático de Medicina

Departamento de Medicina, Dermatología y Otorrinolaringología

Universidad de Córdoba





## **TÍTULO DE LA TESIS: HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO Y CAMBIOS DE FGF-23 EN PACIENTES EN HEMODIÁLISIS.**

**DOCTORANDO: CRISTIAN ROBERTO RODELO HAAD**

### **INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El doctorando Cristian Roberto Rodelo Haad, se incorporó al grupo en 2012 e inició sus estudios de doctorado en 2015 en el grupo de investigación de Nefrología, daño celular en la inflamación crónica y Metabolismo del calcio, Calcificación vascular de IMIBIC. Desde su incorporación ha participado activamente en un gran número de actividades del grupo, mostrando gran resolución en los proyectos en los que ha participado y liderado. Fruto de su vinculación al grupo y de su trabajo ha publicado 13 artículos relacionados con la temática del grupo de investigación. En 9 de ellos, el doctorando figura como primer autor. Además, ha colaborado en el desarrollo de actividades docentes como director de trabajos de fin de grado en la facultad de medicina de la universidad de Córdoba y del contenido programático del módulo de bases celulares y moleculares de las enfermedades renales del Master de Investigación Biomédica Traslacional en la facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba y de cursos de formación continuada organizados por la Sociedad Española de Nefrología. Recientemente, ha participado como autor de un capítulo de libro relacionado con la temática de su tesis doctoral. Actualmente, es miembro de la Sociedad Andaluza de



Nefrología y de la Sociedad Española de Nefrología en la que ha participado como asistente y ponente de comunicaciones en repetidas ocasiones.

La presente Tesis Doctoral, llevada cabo bajo nuestra dirección, se ha desarrollado durante el período comprendido entre el 2015 y 2019 y está encuadrada en el programa de Doctorado en Biomedicina de la Universidad de Córdoba.

A continuación, se detalla la producción científica derivada del programa de doctorado del doctorando.

### **Indicadores generales de calidad de la producción científica:**

**Total de Publicaciones: 13**

### **Publicaciones científicas indexadas:**

**1. Tyrosine-phosphatase and glutamate-decarboxylase antibodies after simultaneous pancreas kidney transplantation: do they have an impact on pancreas graft survival?.**

**Rodelo-Haad C**, Agüera ML, Martínez-Vaquera S, Pendón-Ruiz de Mier MV, Salmerón-Rodríguez MD, Esquivias E, Navarro MD, Rodríguez-Benot A, Aljama P. **Transplant Proc.** 2015 Jan-Feb;47(1):107-11. doi: 10.1016/j.transproceed.2014.11.011.

**2. Short-Term Outcome of Untreated Versus Treated Asymptomatic Bacteriuria in Renal Transplant Patients.**

Arencibia N, Agüera ML, **Rodelo-Haad C**, López I, Sánchez-Agosta M, Hurtarte A, Navarro MD, Rodríguez-Benot A. **Transplant Proc.** 2016 Nov;48(9):2941-2943. doi: 10.1016/j.transproceed.2016.07.041.

**3. Impact of Preformed Donor-Specific Anti-Human Leukocyte Antigen Antibody C1q-Binding Ability on Kidney Allograft Outcome.**

Molina J, Navas A, Agüera ML, **Rodelo-Haad C**, Alonso C, Rodríguez-Benot A, Aljama P, Solana R. **Front Immunol.** 2017 Oct 31;8:1310. doi: 10.3389/fimmu.2017.01310. eCollection 2017

**4. The value of ABPM and subclinical target organ damage parameters in diagnosis of resistant hypertension.**



Poveda García MI, Del Pino Y Pino MD, Alarcón Rodríguez R, **Rodelo-Haad C**, Parrón Carreño T. **Nefrología**. 2019 Jan - Feb;39(1):67-72. doi: 10.1016/j.nefro.2018.03.007. Epub 2018 Jul 9. English, Spanish.

**5. Calcific arteriolopathy beyond Chronic Kidney Disease. The role of hemochromatosis and vitamin K antagonists.**

**Rodelo-Haad C.-H.**, De La Puebla Gimenez R.F., Ortega R., Rodriguez M., Aljama P. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**. 15 - 1, pp. 85 - 88. 07/04/2018. DOI: 10.11138/ccmbm/2017.15.1.085

**6. 24-Hour Proteinuria Versus Spot Protein-Creatinine Ratio for Kidney Transplant Management in Clinical Practice.**

**Rodelo-Haad C**, Esquivias-Motta E, Agüera ML, Aljama P, Rodríguez-Benot A. **Transplant Proc**. 2018 Mar;50(2):560-564. doi: 10.1016/j.transproceed.2017.09.071.

**7. Lithium-associated nephropathy in the renal allograft.**

**Rodelo-Haad C**, Agüera ML, Ortega R, Martinez-Lopez A, Navarro MD, Rodriguez-Benot A, Aljama P. **Kidney Int**. 2018 Jan;93(1):273. doi: 10.1016/j.kint.2017.08.032.

**8. Phosphate control in reducing FGF23 levels in hemodialysis patients.**

**Rodelo-Haad C**, Rodríguez-Ortiz ME, Martin-Malo A, Pendón-Ruiz de Mier MV, Agüera ML, Muñoz-Castañeda JR, Soriano S, Caravaca F, Alvarez-Lara MA, Felsenfeld A, Aljama P, Rodriguez M. **PLoS One**. 2018 Aug 7;13(8):e0201537. doi: 10.1371/journal.pone.0201537. eCollection 2018

**9. Administration of mycophenolic acid is not associated with malformations in descendants from kidney transplanted males.**

Lopez-Lopez I, **Rodelo-Haad C**, Agüera ML, Cabello-Jabalquinto R, Esquivias-Motta E, Navarro MD, Aljama P, Rodriguez-Benot A. **PLoS One**. 2018 Sep 12;13(9):e0202589. doi: 10.1371/journal.pone.0202589. eCollection 2018.

**10. Reversing extraosseous calcifications. A Case of Breast Uremic Calcific Arteriolopathy.**

**Cristian Rodelo-Haad**, Elvira Esquivias-Motta, Francisco Amaral-Neiva, Alejandro Martin-Malo, Pedro Aljama and Mariano Rodriguez. **The Breast Journal**. Accepted. Sept 2018

**11. Pancreatic autoantibodies and CD14+CD16+ monocytes subset are associated with the impairment of  $\beta$ -cell function after simultaneous pancreas-kidney transplantation.**

**Rodelo-Haad C**, Agüera ML, Carmona A, Navarro MD, Carracedo J, Rodríguez-Benot A, Aljama P. **PLoS One**. 2019 Feb 22;14(2):e0212547. doi: 10.1371/journal.pone.0212547

**12. Calcimimetics maintain bone turnover in uremic rats despite the concomitant decrease in parathyroid hormone concentration.**

Díaz-Tocados JM, Rodríguez-Ortiz ME, Almadén Y, Pineda C, Martínez-Moreno JM, Herencia C, Vergara N, Pendón-Ruiz de Mier MV, Santamaría R, **Rodelo-Haad C**, Casado-Díaz A, Lorenzo V, Carvalho C, Frazão JM, Felsenfeld AJ, Richards WG, Aguilera-Tejero E, Rodríguez M, López I, Muñoz-Castañeda JR. **Kidney Int**. 2019 May;95(5):1064-1078.

**13. FGF23, Biomarker or Target?**

**Rodelo-Haad C**, Santamaria R, Muñoz-Castañeda JR, Pendón-Ruiz de Mier MV, Martín-Malo A, Rodríguez M. **Toxins (Basel)**. 2019 Mar 22;11(3). pii: E175. doi: 10.3390/toxins11030175. Review.

**Comunicaciones a Congresos Nacionales e Internacionales:**

- **Congreso De La Sociedad Española De Nefrología. Octubre 2016. Comunicación Oral (2).**
- **53rd Era-Edta Congress. European Renal Association-European Dialysis and Transplantation Association Congress. Vienna – Austria. Mayo 2016.**
- **Congreso De La Sociedad Española De Trasplante De Órgano Sólido. Marzo 2016. Comunicación Oral (1).**
- **54rd ERA-EDTA Congress. European Renal Association-European Dialysis and Transplantation Association Congress. Madrid. Junio 2017. Comunicación Poster (2).**
- **Congreso De La Sociedad Europea de Trasplante de Órgano sólidos. Septiembre DE 2017. Comunicación Oral (2).**
- **Congreso De La Sociedad Española De Nefrología. Octubre 2017. Comunicación Oral (1), Comunicación poster (1).**



- **Congreso De La Sociedad Española De Nefrología. Noviembre 2018. Comunicación oral (1).**
- **7TH IMIBIC Young Investigators Meeting. Mayo 2016. Comunicación Poster (1).**
- **8TH IMIBIC Young Investigators Meeting. Mayo 2017. Comunicación Poster (1).**
- **9TH IMIBIC Young Investigators Meeting. Mayo 2018.**

#### **Comunicaciones a Congresos Regionales:**

- **Congreso De La Sociedad Andaluza De Nefrología. Mayo 2016. Comunicación oral.**
- **Congreso De La Sociedad Andaluza De Nefrología. Abril 2018.**

#### **Libros:**

- **Co-autor: Monografías de Dermatología. Manifestaciones cutáneas en enfermedades renales. Manifestaciones Cutáneas En Los Pacientes En Diálisis. Visión De Un Nefrólogo. 2017.**
- **Co-autor: Capitulo de Libro: Patologías asociadas a alteraciones de la regulación del FGF23. Patologías por déficit de FGF23. Calcinosis tumoral familiar hiperfosfatémica. Capítulo 5. 2019.**

#### **Premios:**

- **8TH IMIBIC Young Investigators Meeting. Mayo 2017. Premio a la mejor comunicación Poster 2017.**
- **Congreso De La Sociedad Andaluza De Nefrología. Abril 2017. Premio a la mejor comunicación oral 2017.**

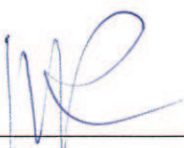
**Apoyo en Actividades Docentes:**

- **Co-director Trabajo de Fin de Grado Estudiante de Medicina (2016).**
- **Co-director Trabajo de Fin de Grado Estudiante de Medicina 2017 (Matrícula de Honor).**
- **Docente Curso Online Controversias en la Enfermedad Renal Crónica organizado por la Sociedad Española de Nefrología. 2017-2018.**
- **Docente en la asignatura “Bases Celulares y Moleculares de las Enfermedades Renales” dentro del master “Investigación Biomédica Traslacional”, 2019.**

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 22 de Mayo de 2019

Firma de los directores

Fdo.: 

Prof. Mariano Rodríguez Portillo

Fdo.: 

Prof. Alejandro Martín Malo



**D. JUAN MARIANO RODRIGUEZ PORTILLO**, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA, DERMATOLOGÍA Y OTORRINOLARINGOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA E INVESTIGADOR RESPONSABLE DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE METABOLISMO DEL CALCIO Y CALCIFICACIÓN VASCULAR DEL INSTITUTO MAIMÓNIDES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE CÓRDOBA.

INFORMA:

Que D. **Cristian Roberto Rodelo Haad** ha realizado bajo mi dirección, de forma conjunta entre el Departamento de Medicina, Dermatología y Otorrinolaringología de la Universidad de Córdoba y el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), el trabajo titulado:

**“HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO Y CAMBIOS DE FGF-23 EN PACIENTES EN HEMODIÁLISIS”**, y que a mi criterio dicho trabajo cumple con la estructura y los indicios de calidad requeridos por la normativa vigente y muestra una correcta correspondencia entre los objetivos planteados y los resultados obtenidos. Resultados que son de gran relevancia desde el punto de vista científico con varias aportaciones tanto a revistas como a congresos de ámbito internacional.

Por todo ello, autorizo la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, a veinte de Mayo de dos mil diecinueve.

---

Fdo: Prof. Mariano Rodriguez Portillo.





**D. ALEJANDRO MATÍN MALO**, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE NAVARRA, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA, DERMATOLOGÍA Y OTORRINOLARINGOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA Y JEFE DE SECCIÓN DE HEMODIÁLISIS DE LA UNIDAD DE GESTIÓN CLÍNICA DE NEFROLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA DE CÓRDOBA.

INFORMA:

Que D. **Cristian Roberto Rodelo Haad** ha realizado bajo mi dirección, de forma conjunta entre el Departamento de Medicina, Dermatología y Otorrinolaringología de la Universidad de Córdoba y el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), el trabajo titulado:

**“HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO Y CAMBIOS DE FGF-23 EN PACIENTES EN HEMODIÁLISIS”**, y que a mi criterio dicho trabajo cumple con la estructura y los indicios de calidad requeridos por la normativa vigente y muestra una correcta correspondencia entre los objetivos planteados y los resultados obtenidos. Resultados que son de gran relevancia desde el punto de vista científico con varias aportaciones tanto a revistas como a congresos de ámbito internacional.

Por todo ello, autorizo la presentación de la Tesis Doctoral

Córdoba, a veinte de Mayo de dos mil diecinueve.

---

Fdo: Prof. Alejandro Martín Malo





## **AGRADECIMIENTOS.**

La planeación, confección y desarrollo de esta tesis doctoral amerita el agradecimiento a varias personas, sin la ayuda de los cuales no habría podido terminarse. Sin su ánimo, impulso y conocimientos, este trabajo presentaría deficiencias e interrogantes mucho mayores de las que hoy aún contiene. Por este motivo, quiero agradecer profundamente la participación de todas las personas que han influido directa o indirectamente durante los últimos años en el trabajo resumido en esta memoria.

He de agradecer ante todo a el Dr. Mariano Rodríguez Portillo y al Dr. Alejandro Martín Malo, director y co-director y máximos conocedores del tema de esta tesis, sin cuyo apoyo, orientación y conocimientos, este trabajo no hubiese podido llevarse a cabo. A la Dra. María Antonia Álvarez de Lara y la Dra. Sagrario Soriano, por su impulso y apoyo durante todo este periodo; al Dr. Pedro Aljama García cuyas recomendaciones y críticas constructivas lograron que este trabajo lograra transmitir los conocimientos y nuevos hallazgos que se han producido a partir de nuestra investigación. Agradezco profundamente el apoyo, la confianza, la paciencia y el estímulo que desde el primer momento han proporcionado para la realización de este proyecto de Tesis, así como la crítica y valoración del incesante y duro trabajo diario.

Mención especial merecen, la Dra. María Encarnación Rodríguez Ortiz y el Dr. Juan Rafael Muñoz Castañeda, cuya inestimable ayuda en el procesamiento y análisis de muestras sanguíneas, hicieron mi trabajo más fácil. A la Dra. María Luisa Agüera Morales, sin cuyo consejo, crítica, apoyo y soporte en el área de estadística, este trabajo habría tenido deficiencias.

A mi familia y amigos más cercanos, por saber respetar mi trabajo, comprender mi estado de ánimo y ayudarme en los momentos difíciles.

En estas páginas, con la ayuda de todos vosotros, expongo los resultados obtenidos del estudio del hiperparatiroidismo secundario y cambios en FGF23 en pacientes en hemodiálisis, mi Tesis Doctoral.

*A mi familia y a ti, Sarai.*



## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADHR:** Raquitismo hipofosfémico autosómico dominante

**AsRVD:** Agentes estimulantes del receptor de vitamina D

**ATII:** Angiotensina II

**BMI:** Índice de masa corporal

**1,25 (OH)<sub>2</sub> D:** Calcitriol

**Ca:** calcio sérico total

**iCa:** Calcio iónico sérico

**CV:** Calcificaciones vasculares

**DMP1:** Proteína matricial de la dentina

**ECV:** Enfermedad cardiovascular

**ERC:** Enfermedad renal crónica

**ERC-HD:** Enfermedad renal crónica en hemodiálisis

**ERC-EOM:** Enfermedad ósea-metabólica asociada a la enfermedad renal crónica

**DP:** Diálisis peritoneal

**FG:** Filtrado glomerular

**FGF23:** Factor de crecimiento fibroblástico 23

**iFGF23:** Factor de crecimiento fibroblástico 23 intacto

**cFGF23:** Factor de crecimiento fibroblástico 23 c-terminal

**FGFR:** Receptor de FGF23

**GALNT3:** UDP-N-acetil- $\alpha$ -D-galactosamina 3

**Hb:** Hemoglobina

**hs-CRP:** Proteína C-reactiva

**HD:** Hemodiálisis

**HF-HD:** Hemodiálisis de alto Flujo

**(HIF)-1 $\alpha$ :** Factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$

**HPTS:** Hiperparatiroidismo secundario

**HVI:** Hipertrofia del ventrículo izquierdo

**IAM:** Infarto agudo de Miocardio

**ICC:** Insuficiencia cardiaca congestiva

**IGF-I:** Factor de crecimiento similar a la insulina

**IL-6:** Interleuquina 6

**IL-8:** Interleuquina 8

**IL-1 $\beta$ :** Interleuquina 1  $\beta$ eta

**MPG:** Proteína GLA de la matriz

**NCC:** Cotransportador Sodio/Cloro

**OL-HDF:** Hemodiafiltración online

**OPG:** Osteoprotegerina

**PHEX:** Gen regulador de fosfato con homologías al cromosoma X

**PM:** Peso molecular

**Pre-HD:** Pre-diálisis

**Post-HD:** Post-diálisis

**SC:** Coeficiente de cribado

**TGF- $\alpha$ :** Factor de crecimiento transformante alfa.

**TNAP:** Fosfatasa alcalina no específica

**TRPV5:** Receptor de calcio de membrana 5

**UF:** Ultrafiltración

**VDR:** Receptor vitamina D





## ÍNDICE

1. <b>RESUMEN</b> .....	1
2. <b>ABSTRACT</b> .....	6
3. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
4. <b>HIPÓTESIS</b> .....	16
5. <b>OBJETIVOS</b> .....	18
6. <b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
6.1. <b>Consideraciones Generales</b> .....	21
6.1.1. Patogénesis del HPTS. Papel del calcio, fosfato, calcitriol y PTH. ....	21
6.1.2. Desarrollo de Calcificaciones vasculares e HPTS .....	27
6.2. <b>FGF23</b> .....	30
6.2.1. Origen y estructura de FGF23 .....	31
6.2.2. Funciones de FGF23 .....	34
6.2.3. Klotho y receptores FGFR .....	35
6.3. <b>FGF23 y su efecto en diferentes órganos</b> .....	36
6.3.1. Riñón .....	36
6.3.2. Glándula Paratiroides .....	38
6.3.3. Corazón .....	38
6.3.4. Hígado .....	40
6.3.5. Sistema inmunitario .....	41
6.3.6. Hueso .....	42
6.3.7. Anemia .....	43
6.3.8. Otros .....	43
6.4. <b>Regulación de FGF23</b> .....	45
6.4.1. Vitamina D .....	45
6.4.2. Fosfato .....	45
6.4.3. Calcio y PTH .....	46
6.4.4. Inflamación y ferropenia .....	49
6.4.5. Eritropoyetina .....	50
6.4.6. Otros .....	50
6.4.7. Reguladores locales óseos .....	52
6.5. <b>FGF23 en la Enfermedad Renal Crónica</b> .....	52
6.6. <b>Impacto Clínico y Aproximación Terapéutica Para El Control Del HPTS y FGF23</b> .....	53
6.6.1. Restricción de fosfato: Dieta .....	55
6.6.2. Captadores de Fosfato .....	56
6.6.3. Vitamina D y análogos .....	57
6.6.4. Calcio .....	58
6.6.5. Calcimiméticos .....	59
6.6.6. Paratiroidectomía .....	60
7. <b>METODOLOGÍA GENERAL</b> .....	63
7.1.1. Criterios de inclusión y exclusión generales .....	63
7.1.2. Muestras de sangre, medidas y ensayos de determinación .....	63

8. <b>RESULTADOS</b> .....	67
8.1. <b>CAPÍTULO 1</b> .....	68
8.2. <b>FACTORES RELACIONADOS CON EL INCREMENTO DE FGF23</b> .....	68
8.2.1.Métodos.....	68
8.2.2.Resultados .....	70
8.2.3.Conclusiones específicas.....	84
9. <b>CAPITULO 2</b> .....	85
9.1. <b>EVALUAR LA CAPACIDAD DEL FILTRO DE HEMODIÁLISIS EN LA ELIMINACIÓN DE FGF23 DURANTE UNA SESIÓN DE HEMODIÁLISIS..</b>	85
9.1.1.Métodos.....	85
9.1.2.Resultados .....	87
9.1.3.Conclusiones específicas.....	91
10. <b>CAPITULO 3</b> .....	92
10.1. <b>CAMBIOS AGUDOS DE FGF23 DURANTE UNA SESIÓN DE HEMODIÁLISIS Y SUS DETERMINANTES</b> .....	92
10.1.1 Métodos .....	92
10.1.2 Resultados .....	94
10.1.3 Conclusiones específicas .....	102
11. <b>CAPITULO 4</b> .....	103
11.1. <b>VALORAR SI LA REDUCCIÓN O EL AUMENTO EN LOS NIVELES DE FOSFATO SE RELACIONAN CON UNA DISMINUCIÓN O INCREMENTO DE LOS NIVELES DE FGF23 EN PACIENTES EN HEMODIÁLISIS. ....</b>	103
11.1.1 Métodos .....	103
11.1.2 Resultados .....	107
11.1.3 Conclusiones Específicas .....	115
12. <b>DISCUSIÓN</b> .....	117
12.1. <b>Analizar los factores relacionados con la regulación de ambas isoformas de FGF23 (intacta y c-terminal) en pacientes en hemodiálisis</b> .....	117
12.2. <b>Evaluar la capacidad del filtro de hemodiálisis en la eliminación de FGF23 durante una sesión de hemodiálisis. ....</b>	125
12.3. <b>Analizar sí los niveles sanguíneos de FGF23 sufren modificaciones agudas durante el transcurso de la hemodiálisis. Se valorará sí estos cambios se correlacionan con alguno de los factores relacionados con su producción como son los niveles plasmáticos de fosfato, calcio y hormona paratiroidea (PTH) o si por el contrario los cambios en FGF23 están determinados por la diálisis <i>per se</i>. ....</b>	130
12.4. <b>Valorar si los cmbios mantenidos en la concentración de fosfato regulan los niveles de FGF23 (iFGF23 y cFGF23) en pacientes hemodiálisis. ....</b>	134
13. <b>CONCLUSIONES FINALES</b> .....	137
14. <b>REFERENCIAS</b> .....	139
15. <b>ANEXOS</b> .....	168
15.1. <b>Articulo</b> .....	168





# ***RESUMEN***





## ***1. RESUMEN***

La enfermedad renal crónica (ERC) está aumentando en todo el mundo y se ha convertido en una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. En este contexto, las alteraciones del metabolismo óseo mineral, incluido el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23), desempeñan un papel fundamental en el hiperparatiroidismo secundario y en el desarrollo de calcificaciones vasculares. Los niveles séricos de FGF23 están extremadamente altos en los pacientes en hemodiálisis (HD) y se asocian a una un alto mayor mortalidad. Consecuentemente, los pacientes en HD muestran un alto riesgo de muerte. Aunque inicialmente se pensó, que FGF23 regulaba exclusivamente el metabolismo del fosfato y la vitamina D, investigaciones recientes han demostrado que FGF23 es crucial en la compleja red de comunicaciones entre el hueso y otros órganos. Además, un exceso de FGF23 tiene efectos descubiertos recientemente “no clásicos” que pueden ser en ocasiones son perjudiciales. Por lo tanto, es de gran importancia identificar los factores que pueden intervenir en la regulación del FGF23 en pacientes en diálisis.

Para abordar este problema, se han diseñado cuatro estudios diferentes. Primero, se han estudiado las variables con un efecto potencial en los niveles de FGF23. En segundo lugar, se evalúa el aclaramiento de FGF23 durante la diálisis. En tercer lugar, se han determinado los factores asociados con los cambios agudos en FGF23. Cuarto, realizamos un estudio longitudinal para probar si las modificaciones de fosfato sérico fueron capaces de producir cambios significativos en los niveles de FGF23.

Hemos encontrado que 1) los pacientes en hemodiálisis, con hiperfosfatemia, mostraron aumento de hs-CRP, PTH, iFGF23 y cFGF23. El análisis de regresión múltiple reveló que los niveles de iFGF23 se correlacionaban directamente tanto con el fosfato sérico como con el calcio, mientras que el cFGF23 se correlacionaba con el fosfato sérico y la PCR-hs, pero no con el calcio. Los niveles de cFGF23 estaban estrechamente relacionados con el fosfato sérico y con los parámetros de inflamación; 2) El iFGF23 y el cFGF23 disminuyeron durante la diálisis. Sin embargo, mientras que el cFGF23 mostró una tendencia hacia una reducción progresiva durante la sesión de hemodiálisis, el iFGF23 solo disminuyó al final de la sesión de hemodiálisis; 3) La reducción de iFGF23

se asoció con cambios de calcio. No se observó correlación entre los cambios agudos en fosfato, PTH y FGF23; 4) el control del fosfato sérico se asoció a una reducción del 60% en los niveles circulantes de iFGF23 mientras que no se observaron cambios en los niveles séricos de cFGF23. Los pacientes, que no lograron el control de fosfato, mostraron un aumento de dos veces en iFGF23 y un aumento de cuatro veces en cFGF23. Es importante hacer notar que los cambios de fosfato se correlacionaron con los cambios en la proteína C reactiva (*hs*-CRP).

En síntesis, el fosfato sérico, el calcio y la inflamación son los tres factores más importantes asociados con el aumento de FGF23. De forma aguda, tanto el iFGF23 como el cFGF23 se reducen a lo largo de una sesión de diálisis. Sin embargo, es probable, que los cambios en el calcio sérico sean los responsables de las modificaciones agudas en iFGF23. Finalmente, el control de fosfato sérico redujo el iFGF23 que también se asoció con una disminución de los parámetros inflamatorios.



# ***ABSTRACT***





## **2. ABSTRACT**

Chronic Kidney disease (CKD) is increasing worldwide. It has become one of the leading causes of morbidity and mortality. In this context, bone and mineral abnormalities including fibroblast growth factor 23 (FGF23), play a pivotal role in secondary hyperparathyroidism and the development of vascular calcifications. FGF23 serum levels are extremely high in dialysis patients and predict mortality. As such, hemodialysis patients show a high risk of death. Although it was thought that FGF23 exclusively regulates phosphate and vitamin D metabolism, recent studies have demonstrated that FGF23 is crucial in the complex network between the bone and other organs. Moreover, an excess of FGF23 has non-classic effects that are occasionally detrimental. Therefore, it is of high importance to delineate the factors that may promote FGF23 regulation in dialysis patients.

To address this issue, we designed four different studies. First, we studied variables with a potential effect on FGF23 levels. Second, we evaluated FGF23 clearance throughout dialysis. Third, we assessed the factors associated with acute changes in FGF23. Fourth, we performed a longitudinal study to test whether phosphate modifications were followed by similar changes in FGF23.

We found that 1) hemodialysis patients, with hyperphosphatemia, show increased levels of *hs*-CRP, PTH, iFGF23, and cFGF23. Multiple regression analysis revealed that iFGF23 levels directly correlated with both serum phosphate and calcium, whereas cFGF23 correlated with serum phosphate and *hs*-CRP but not with calcium. The levels of cFGF23 were closely related to serum phosphate and with parameters of inflammation; 2) Either iFGF23 or cFGF23 decreased throughout dialysis. However, whereas cFGF23 showed a trend towards a progressive reduction during the dialysis session, and iFGF23 only decreased at the end; 3) The reduction of iFGF23 was associated with changes in calcium concentration. No correlation was observed between the acute changes in phosphate, PTH and FGF23; 4) serum phosphate control is ensued by 60% reduction in circulating iFGF23 levels whereas no change was observed in cFGF23 serum levels. Those patients who did not achieve phosphate control showed a two-fold increase in

iFGF23 and a four-fold increase in cFGF23. Interestingly, phosphate changes correlated with changes in C-reactive protein (hs-CRP).

In summary, serum phosphate, calcium, and inflammation are the three most important factors associated with FGF23 increase. In the acute setting, both, iFGF23 and cFGF23 reduce throughout a dialysis session. However, it is likely that the changes in serum calcium promote acute modifications in iFGF23. Finally, the control of serum phosphate reduced iFGF23. This reduction was also associated with a decreased in inflammatory parameters.

# ***INTRODUCCIÓN***

### **3. INTRODUCCIÓN**

La enfermedad cardiovascular (ECV) es la principal causa de muerte en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC).<sup>1,2</sup> En el año 2016, la ERC fue la octava causa de muerte en España y se estima que la ERC sea una de las enfermedades con mayor crecimiento estimado en los próximos años, alcanzando el segundo lugar como causa de muerte para el año 2100<sup>3</sup>. Las alteraciones del metabolismo óseo mineral, las calcificaciones vasculares y la disfunción endotelial asociada a la ERC, juegan un papel determinante en la evolución de estos pacientes<sup>4-6</sup>. De hecho, la enfermedad ósea metabólica asociada a la ERC (ERC-EOM) tiene un impacto directo sobre la calidad de vida, la tasa de hospitalizaciones, el riesgo de fracturas secundarias y de muerte en los pacientes con ERC comparados a la población general<sup>7</sup>.

El deterioro progresivo del filtrado glomerular (FG) característico de la ERC se asocia entre otras situaciones a alteraciones de metabolismo fosfo-cálcico, hiperparatiroidismo secundario (HPTS), endurecimiento vascular e hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI)<sup>8-10</sup>. Las estadísticas actuales sugieren que alrededor del 10% de la población mundial padece de ERC, por lo que esta se ha convertido en un reto para los servicios sanitarios dadas las implicaciones sociales y económicas que acarrea<sup>11-13</sup>. Si consideramos, además, la alta mortalidad a la que se asocia, el reto no solo implica disminuir su incidencia y progresión sino también la morbilidad y mortalidad asociadas. El reconocimiento precoz e intervención sobre los factores de riesgo tradicionales como la hipertensión y la diabetes mellitus, las dos principales causas de ERC, altamente prevalentes en la población con ERC, no ha logrado disminuir esta alta mortalidad por lo que la intervención sobre otros factores de riesgo no tradicionales es fundamental<sup>14</sup>.

Las causas subyacentes del hiperparatiroidismo secundario (HPTS) y de las calcificaciones vasculares (CV) en los pacientes con ERC son múltiples<sup>15-17</sup>. Las alteraciones del metabolismo óseo mineral, juegan un rol determinante en su fisiopatogenia<sup>8,9,18-20</sup>. Sin embargo, aunque las alteraciones clásicas del fósforo, calcio y

la PTH continúan siendo parte fundamental de los modelos de HPTS y calcificación vascular, recientemente el complejo *Klotho*-Factor de Crecimiento Fibroblástico 23 (FGF23), se ha posicionado como el eje central de su desarrollo <sup>21-24</sup>.

El HPTS es un trastorno crónico y progresivo, evidente predominantemente en pacientes con ERC que inicia su desarrollo en etapas tan precoces como la ERC estadio 3. De acuerdo con resultados del estudio DOPPS (Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study), se estima una prevalencia cercana al 30% en pacientes con ERC <sup>25</sup>. Aunque el incremento de la PTH clásicamente representaba el hallazgo principal del HPTS, estudios recientes han demostrado que los niveles de FGF23 se incrementan, incluso en etapas tan precoces del desarrollo de ERC cuando los valores de PTH permanecen normales <sup>26</sup>. Con el descenso progresivo del FG, estos mecanismos compensatorios desaparecen parcialmente e inician las manifestaciones clínicas típicas de la ERC-EOM, hiperfosfatemia, hipocalcemia, elevación de la PTH y activación del proceso inflamatorio <sup>7</sup>.

El FGF23 y *Klotho* son dos factores estrechamente relacionados con multitud de desórdenes metabólicos <sup>22</sup>. En el caso de la ERC-EOM, la evidencia sugiere que el aumento de FGF23 y el déficit de *Klotho* tienen un papel determinante, bien sea directo o indirecto, en el desarrollo de HPTS tanto en modelos experimentales como en humanos <sup>4,5,27</sup>. FGF23 es una proteína de 32kD (péptido de 251 aminoácidos), sintetizada principalmente en osteocitos y osteoblastos maduros. FGF23, actúa como la principal proteína reguladora del metabolismo del fosfato favoreciendo su excreción renal, disminuyendo la función de la 1- $\alpha$  hidroxilasa a nivel renal e inhibiendo la producción de PTH a nivel de la glándula paratiroides <sup>19,28-30</sup>. En sangre periférica se pueden determinar dos isoformas de FGF23. La molécula intacta (iFGF23), a la cual se le atribuyen las funciones biológicas de FGF23, y la molécula c-terminal (cFGF23) <sup>31-33</sup>. La medición simultánea de ambas moléculas nos puede ayudar de forma indirecta a evaluar tanto su producción como su proteólisis <sup>31</sup>. Ambas isoformas muestran una alta correlación entre ellas, por lo que se ha asumido una equivalencia casi total entre ambas en sujetos sanos <sup>32</sup>. Sin embargo, otros estudios han demostrado que esta correlación es variable y que puede depender de la inestabilidad de FGF23 tras su conservación en frío, a la acción de

enzimas proteolíticas o a errores aleatorios de medición propios de los kits de determinación <sup>34</sup>. Además, en pacientes con ERC, los niveles de cFGF23 se encuentran más incrementados en relación a los de iFGF23, <sup>35</sup> sugiriendo que la equivalencia de ambas isoformas no es absoluta y no deberían ser utilizadas de forma intercambiable.

*Klotho*, es codificada en dos isoformas, una circulante y otra transmembrana <sup>21,22,36</sup>. Su importancia radica en actuar como co-receptor específico de FGF23 de tal forma que la interacción de ambos es indispensable para ejercer sus funciones <sup>21</sup>. *Klotho* es expresado predominantemente en células del parénquima renal, pero también se ha detectado en cerebro, paratiroides, glándula pituitaria, intestino delgado y colon, próstata, vejiga y músculo esquelético entre otros <sup>36</sup>. Datos recientes ha demostrado que la ERC es una de las causas principales de déficit de *Klotho* incluso en estadios tempranos de la enfermedad. Este hecho podría explicar al menos parcialmente la alta prevalencia de calcificaciones vasculares de la población con ERC <sup>23</sup>. Los efectos anti-calcificación de *Klotho* dependen en parte del efecto que este tiene sobre el fósforo y la vitamina D, promoviendo la excreción renal de fósforo gracias a su interacción con receptores de FGF (FGFR) <sup>36</sup>. El descenso de *Klotho* se asocia estrechamente con aumento progresivo de los niveles de FGF23, niveles elevados de fósforo y PTH y bajos niveles de 1,25 hidroxivitamina D3 (1,25(OH)<sub>2</sub>D) <sup>22,37</sup>.

Diversos estudios en animales han intentado identificar los factores asociados al incremento de los niveles circulantes de FGF23. La carga total de fósforo se ha considerado el principal estímulo para la producción de FGF23 <sup>38-41</sup> y la reducción de sus niveles séricos en pacientes con ERC no en diálisis mediante la utilización de captores del fósforo favorecen un descenso de los niveles circulantes de FGF23 <sup>40</sup>. La hipocalcemia inhibe la producción de FGF23 <sup>42,43</sup> quizás en un intento de evitar que el incremento de FGF23 y el consecuente descenso de la producción de 1,25 (OH)<sub>2</sub>D empeoren la hipocalcemia. Por el contrario, la hipercalcemia ejerce un efecto inhibitorio del descenso de FGF23 en pacientes con HPTS en tratamiento con cinacalcet <sup>44</sup>. La PTH, mediante la inducción del orphan nuclear receptor Nurr1 estimula la producción de FGF23 <sup>45</sup>. Además, ejerce efectos indirectos en la producción de FGF23 mediante cambios en la

concentración de  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$  <sup>46</sup>. De hecho, la paratiroidectomía se asocia a una reducción significativa de FGF23 <sup>47</sup>. Recientemente, modelos animales han demostrado que la inflamación tanto aguda como crónica también se asocian tanto con un incremento en la transcripción como de la proteólisis de FGF23 <sup>48</sup>. La identificación de esta última interrelación es de vital importancia ya que tanto el proceso inflamatorio como FGF23 se asocian de forma independiente a una mayor mortalidad en pacientes con ERC <sup>49-52</sup>.

Los efectos renales y extrarenales de FGF23 están determinados por la existencia de diferentes receptores (FGFR). Desde el FGFR1, predominante en glándulas paratiroides y riñones, hasta el FGFR4 predominante en corazón e hígado, FGF23 se asocia a efectos clásicos y no clásicos algunos de ellos deletéreos como la HVI y a la producción de citoquinas inflamatorias <sup>53-55</sup>. Además, actúa sobre neutrófilos y macrófagos disminuyendo su reclutamiento y proliferación, incrementando el riesgo de infecciones <sup>56</sup>. Todo lo anterior ubica a FGF23 como un potencial target terapéutico <sup>57</sup>.

En pacientes en HD, la homeostasis del fosfato está sujeta directamente a la ingesta que realiza el paciente, al uso de captores de fosfato y al porcentaje de fosfato eliminado en cada sesión de diálisis. En estos pacientes, el riesgo de morir es hasta 10 veces superior al compararlo con la población general <sup>58</sup>. La ECV, cuyo desarrollo se ve favorecido entre otros factores por las alteraciones típicas de la ERC-EOM y el incremento extremo de FGF23 <sup>59-61</sup> son en gran parte responsables de esta elevada mortalidad. El desarrollo de medidas terapéuticas que conlleven a la reducción de los niveles de fosfato y FGF23 son de vital importancia para restablecer la homeóstasis óseo-mineral. A día de hoy disponemos de una gran variedad de formulaciones farmacéuticas que restablecen parcialmente este equilibrio. La existencia de captores de fosfato, bien con contenido cálcico o sin él han demostrado una reducción de los niveles de fosfato y consecuentemente de PTH. Sin embargo, en el caso de los captores con contenido cálcico se recomienda restringir su uso dada su asociación con el desarrollo de calcificaciones coronarias en pacientes con ERC <sup>62-64</sup>. Los agentes bloqueantes del receptor sensor de calcio (CaSR) como el cinacalcet y los agentes estimulantes de receptores de vitamina D (AsRVD), potentes moduladores de la PTH, también pueden influenciar los valores

sanguíneos de FGF23 <sup>65-67</sup>. Finalmente, la paratiroidectomía, reservada para pacientes con HPTS refractario no solo ha demostrado reducir los niveles de PTH y FGF23 sino también la mortalidad <sup>46,47,68</sup>. A pesar de lo anterior, el tratamiento dirigido al restablecimiento en los niveles de fosfato, calcio, vitamina D y PTH parece no ser suficiente para reducir las complicaciones asociadas a la ERC-EOM y por tanto, diferentes aproximaciones terapéuticas deben ser valoradas <sup>13</sup>.

En este sentido, el estudio del efecto de la técnica de diálisis sobre los niveles de FGF23 podría ser de utilidad. Un estudio reciente, bajo la premisa que un mejor control del fosfato sérico, conseguido con hemodiálisis más frecuentes, podría asociarse a cambios en FGF23 demostró que los pacientes sometidos a hemodiálisis diaria presentaban niveles significativamente más bajos de FGF23 en comparación con aquellos que recibieron hemodiálisis convencional 3 veces por semana <sup>69</sup>. Los autores de este estudio sustentan estos resultados en el descenso en los niveles de fosfato ya que hasta la fecha no existe evidencia que la técnica de diálisis empleando membranas de alta permeabilidad o las modificaciones agudas en los niveles de calcio, fosfato y PTH observados durante la sesión de diálisis determinen cambios en los niveles de FGF23 <sup>70</sup>. Por esto, planteamos la realización de un estudio transversal en el que se incluirán pacientes prevalentes en hemodiálisis que reciben hemodiálisis 3 veces por semana, en quienes en un primer momento se analizará e identificará los factores asociados con el incremento de los niveles circulantes de FGF23. Posteriormente, se realizará un estudio cruzado en el que se analizará al inicio y al final de la sesión de diálisis de la mitad de la semana los cambios potenciales de calcio, fosfato, PTH, vitamina D y FGF23, así como la potencial correlación entre ellos. Con esto, pretendemos identificar los factores que potencialmente podrían estar implicados en estas modificaciones. Finalmente, mediante un estudio longitudinal prospectivo valorará si los cambios en los niveles de fosfato a mediano plazo se asocian a cambios en los niveles de FGF23.

La identificación de los factores asociados al incremento de FGF23 en pacientes en HD, no solo nos permitiría confirmar las evidencias experimentales que se plantean actualmente en animales, sino que adicionalmente, nos permitiría identificar a FGF23 no



solo un marcador temprano de ERC, sino también como objetivo terapéutico en pacientes en hemodiálisis. La identificación de estos factores, nos permitiría construir aproximaciones terapéuticas dirigidas al descenso en los niveles de FGF23 que eventualmente se traduzcan en una reducción de las tasas de morbilidad de estos pacientes.

# ***HIPÓTESIS***

#### ***4. HIPÓTESIS***

Los datos existentes en la literatura no son consistentes con respecto a la potencial correlación entre los niveles de FGF23 y fosfato en pacientes en hemodiálisis. Tampoco se conoce con certeza si la modificación de los niveles de fosfato sérico se traduce en cambios de FGF23 en esta población. Es posible que la PTH y los niveles de calcio oscurezcan una correlación significativa entre FGF23 y fosfato sérico.

Por esto, se plantea la hipótesis de que FGF23 se correlaciona con los niveles séricos de fosfato y con otros parámetros como el calcio y la PTH. Es posible que las correlaciones entre FGF23 con los demás parámetros no sea equiparable si se considera el FGF23 intacto o el c-terminal. Por tanto, los resultados conocidos hasta el momento podrían ser diferentes basados en las diferentes moléculas de FGF23 medidas, lo que explicaría la heterogeneidad de los resultados conocidos hasta el momento. Creemos que un control del fosfato sérico puede asociarse a un descenso en los niveles de FGF23. El conocimiento de los factores asociados al incremento de iFGF23 y cFGF23, nos permitirá avanzar en el diseño de estrategias terapéuticas encaminadas a su reducción y una potencial mejoría en la supervivencia de la población en HD.

# ***OBJETIVOS***

## **5. OBJETIVOS**

En base a estos antecedentes y la hipótesis, los objetivos principales planteados fueron los siguientes:

1. Analizar los factores relacionados con la regulación de ambas isoformas de FGF23 (intacta y c-terminal) en pacientes en hemodiálisis.
2. Evaluar la capacidad del filtro de hemodiálisis para eliminar FGF23 durante una sesión de hemodiálisis.
3. Analizar si los niveles sanguíneos de FGF23 sufren modificaciones durante el transcurso de la hemodiálisis. Se valorará si estos cambios se correlacionan con alguno de los factores relacionados con su producción como son los niveles plasmáticos de fosfato, calcio y hormona paratiroidea (PTH) o si por el contrario los cambios en FGF23 están determinados por la diálisis *per se*.
4. Valorar si los cambios mantenidos en la concentración de fosfato regulan los niveles de FGF23 (iFGF23 y cFGF23) en pacientes en hemodiálisis.



# ***REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA***

## **6. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **6.1 Consideraciones Generales**

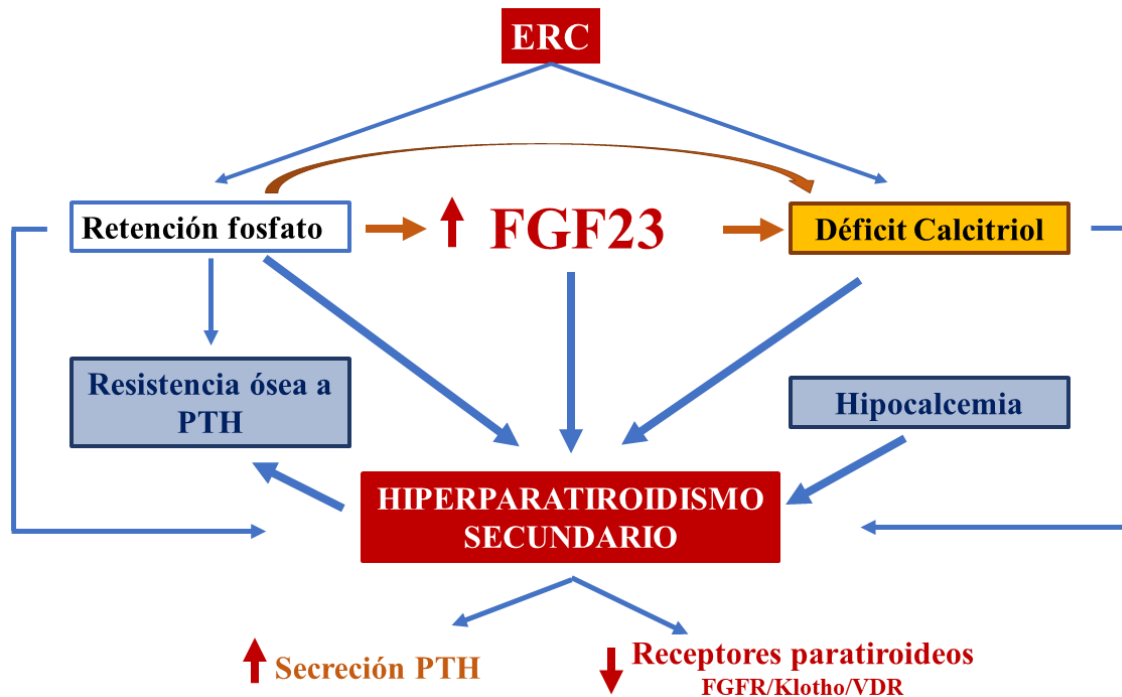
#### **6.1.1 Patogénesis del HPTS. Papel del calcio, fosfato, calcitriol y PTH.**

La ECV es la principal causa de mortalidad en los pacientes con ERC. La historia natural de la enfermedad determina la presencia de factores de riesgo tanto tradicionales como no tradicionales que empobrecen el pronóstico vital de estos pacientes <sup>2,71</sup>. A pesar de que muchos de estos factores de riesgo son controlables mediante la utilización de tratamientos específicos y que en población general se han asociado a una mejora en la morbilidad, en los pacientes con ERC que reciben hemodiálisis los beneficios son limitados <sup>72,73</sup>. Las alteraciones en el metabolismo óseo mineral son muy frecuentes en pacientes con ERC, con una prevalencia estimada de alrededor del 30% <sup>25</sup>. El control de estas alteraciones, inicialmente adaptativas, nos brindan la oportunidad de llevar a cabo intervenciones terapéuticas adicionales que podrían impactar beneficiosamente en la supervivencia de los pacientes.

Las alteraciones bioquímicas, clínicas, y las calcificaciones extraóseas asociadas a la ERC definen la enfermedad ósea-metabólica (ERC-EOM) característica del HPTS en pacientes con ERC <sup>17,74,75</sup>. El mantenimiento de la homeostasis de cada uno de sus componentes está determinado por la señalización uni o bidireccional entre varios órganos y sistemas. El riñón juega un papel fundamental en el mantenimiento de esta homeostasis, por lo que la ERC es la principal causa asociada a estas alteraciones. Por tanto, se considera el HPTS un trastorno adaptativo al deterioro de la función renal que mantenido en el tiempo ocasiona la aparición de las manifestaciones clínicas típicas como la hipocalcemia, hiperfosfatemia, incremento de la PTH, descenso en la producción de calcitriol, incremento en los niveles de FGF23, descenso de *Klotho* y el desarrollo de calcificaciones vasculares (Figura 1) <sup>7,76</sup>. Una vez iniciada la cascada de eventos que favorecen el desarrollo del HPTS, los trastornos adaptativos sucesivos conllevan a la perpetuación del



circulo vicioso en un intento de restablecer la homeóstasis. Así, las alteraciones en cada uno de los componentes del metabolismo óseo-mineral conllevan ineludiblemente a una alteración en varios de sus componentes.



**Figura 1. Fisiopatología del HPTS asociado a ERC.** Adaptado de Rodríguez M y cols.

76

El HPTS inicia su desarrollo en estadios tempranos de la ERC, aunque sus manifestaciones bioquímicas floridas lo hacen más tardíamente <sup>77</sup>. Hasta hace algunos años, se consideraba que los niveles de calcio sérico, fosfato, PTH y calcitriol conformaban las principales e incluso más precoces alteraciones observadas en el HPTS. Sin embargo, esta concepción ha cambiado desde el descubrimiento del conjunto FGF23/Klotho <sup>78</sup>. Estudios recientes han demostrado que FGF23 es el primer componente de la ERC-EOM en incrementarse. FGF23, como se desarrollará en profundidad en próximos apartados, es una fosfatona que regula directamente la reabsorción tubular de fosfato mediante la inhibición de receptores de fosfato dependientes de sodio del tipo 2 (NaPi2) <sup>79,80</sup> y consecuentemente mantiene los niveles de fosfato sérico dentro de la normalidad hasta estadios avanzados de la ERC. <sup>26</sup> Isakova y colaboradores <sup>26</sup> demostraron que pacientes con ERC en estadios precoces no presentaban un incremento

en los niveles de fosfato sérico gracias al incremento de FGF23. Estos pacientes permanecieron con niveles de PTH dentro de la normalidad por lo que la ingesta de una dieta con alto contenido en fosfato se asoció a un incremento en su excreción renal sin apenas repercutir en los niveles de PTH. Sin embargo, los niveles de FGF23 se incrementaron desde estadios precoces de la ERC. A pesar de esto, aunque a día de hoy FGF23 se ha posicionado como la fosfatonina mejor estudiada, no se le deben atribuir de forma exclusiva las funciones del mantenimiento de la homeostasis del fosfato debido a que otro estudio en ratas demostró que, tras la infusión de grandes cantidades de fosfato a nivel intestinal, la excreción renal de fosfato se incrementó independientemente de cambios en FGF23, lo que sugiere la existencia de proteínas adicionales que contribuyen a la homeóstasis del fosfato principalmente en el contexto agudo <sup>81</sup>.

De forma simultánea al deterioro progresivo de la función renal, existe un descenso progresivo en los niveles de calcitriol. Este descenso ocasiona un incremento de la producción de PTH en un intento de mantener los niveles de calcio normales. Sin embargo, la persistencia de este estímulo ocasiona la hiperplasia de las células paratiroides que pierden su fenotipo fisiológico disminuyendo la expresión de receptores sensores de calcio (CaSR), de vitamina D (VDR) y de FGFR1/Klotho. Esto último ocasiona una disminución en la sensibilidad de esta glándula a los cambios en el calcio sérico, calcitriol y FGF23 respectivamente <sup>9,82,83</sup>. La PTH juega un papel fundamental en la homeóstasis del calcio de tal forma que pequeñas oscilaciones en los niveles de calcio se traducen en grandes cambios en los niveles de PTH para restablecer estas alteraciones. La glándula paratiroidea, expresa en su superficie, entre otros, receptores CaSR <sup>84</sup>. Estos receptores se encargan de recibir señales que estimulan o inhiben la liberación de PTH para mantener dentro de un margen estrecho los niveles de calcio a través de la reabsorción ósea que favorece la salida tanto de calcio como de fosfato desde el hueso, incremento de la reabsorción tubular de calcio e indirectamente favoreciendo la producción de calcitriol a nivel renal <sup>74,77</sup>. En la actualidad, existe gran interés en la modulación del CaSR, utilizándose como diana terapéutica en el tratamiento del HPTS con calcimiméticos <sup>65,85,86</sup>. Adicionalmente, los diferentes polimorfismos de este receptor han permitido conocer algunas diferencias existentes entre pacientes con ERC que cursan

con formas más severas de HPTS y que responden de forma diferente al tratamiento <sup>87</sup>. Sin embargo, a pesar de esto, los diferentes polimorfismos del CaSR no se han logrado asociar a peores resultados en relación con el desarrollo y progresión de la ECV o a una mayor mortalidad en pacientes con ERC <sup>88,89</sup>. Múltiples factores asociados se han descrito como moduladores del CaSR. La región promotora del gen de CaSR responde de forma directa a la vitamina D, de tal forma que el calcitriol regula la expresión de los CaSR a nivel transcripcional <sup>90</sup>. El fosfato sérico, que favorece la proliferación e hiperplasia de las células paratiroides también actúa como modulador de la expresión de CaSR, ya que a medida que el HPTS progresa se reduce la expresión de CaSR en las células paratiroides <sup>91</sup>. Recientemente, se ha sugerido que el uso de calcimiméticos incrementa la expresión del CaSR promoviendo la proliferación de células exofíticas ricas en CaSR a nivel paratiroideo <sup>92,93</sup>. En presencia de la glándula paratiroides, el desarrollo de hipocalcemia sintomática se previene mediante el incremento de la PTH. Sin embargo, en estadios avanzados de HPTS, la pérdida de CaSR de la superficie de la célula paratiroidea ocasiona una resistencia a la acción inhibitoria del calcio sobre la PTH, por lo que se requieren niveles superiores de calcio para inhibir la liberación de PTH, lo que se traduce en una progresión del HPTS <sup>94</sup>. La hipocalcemia, por otra parte, disminuye la expresión de VDR, exacerbando el HPTS por pérdida de la inhibición en la producción de PTH mediada por el calcitriol <sup>95</sup>.

A nivel óseo, la PTH lleva a cabo su acción mediante la estimulación de receptores del ligando nuclear  $\kappa$ -B (RANKL) osteoblástico que favorece el incremento en el número de osteoblastos, la reabsorción ósea y la liberación de fosfato <sup>30,96</sup>. La perpetuación de este mecanismo de diferenciación de osteoclastos favorecido por la PTH promueve la pérdida de mineralización ósea y la aparición de osteopenia y osteoporosis <sup>97</sup>. Sin embargo, este efecto parece ser diferente con el aporte exógeno de fragmentos de PTH que estimulan la formación de hueso cortical y trabecular <sup>98</sup>. Es posible que, mediante este mecanismo de estimulación osteoblástico, la PTH estimule la producción de FGF23 en un intento de disminuir la reabsorción tubular renal de fosfato y la producción de calcitriol <sup>28</sup>.

El fosfato es otro de los componentes del metabolismo óseo mineral estrechamente relacionado con el desarrollo y progresión del HPTS. Además, su incremento se asocia al desarrollo de CV, ECV y muerte en población general y pacientes con ERC en diálisis

<sup>61,99,100</sup>. El deterioro progresivo de la función renal favorece su retención, si bien solo se observan niveles elevados en estadios avanzados de la ERC. El fosfato sérico favorece la producción y secreción de PTH <sup>101-103</sup> y por el contrario, el descenso de sus niveles se asocian a una disminución de la PTH circulante independientemente del calcio y magnesio sérico <sup>104</sup>. Estudios en animales han demostrado que los niveles persistentemente elevados de fosfato favorecen la hiperplasia de las células paratiroides <sup>102,105</sup> aunque el mecanismo mediador se desconoce. De forma indirecta, el fosfato disminuye la producción de calcitriol a nivel renal y también favorece la resistencia ósea a la acción de la PTH. Por otra parte, la PTH y el calcitriol han sido los factores clásicos relacionados con el control de los niveles séricos de fosfato <sup>96</sup>. Mediante su acción a nivel tubular renal, la PTH actúa inhibiendo la reabsorción tubular de fosfato. Sin embargo, mediante la reabsorción ósea, libera calcio y fosfato a la circulación. Adicionalmente, la PTH también estimula la absorción intestinal de fosfato mediante la producción de calcitriol secundario a la sobre activación de la  $1\alpha$ -hidroxilasa <sup>30</sup>.

La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  es sintetizada principalmente a nivel renal gracias a la hidroxilación de la  $25(\text{OH})\text{D}$  mediado por la  $1\alpha$ -hidroxilasa. La vitamina D inhibe la producción de PTH. Este efecto inhibitorio está mediado por la estimulación directa de los VDR o de forma indirecta tras favorecer el incremento en el calcio sérico <sup>9,77,106</sup>. Adicionalmente, el calcitriol disminuye la proliferación de células paratiroides mediante la regulación del factor de transcripción de c-myc <sup>107</sup>, supresión del TGF- $\alpha$  y la inducción de p21 <sup>108</sup>. Consecuentemente, el déficit de calcitriol propio de los estadios avanzados de la ERC se asocia a un incremento de la PTH <sup>8,74,109,110</sup>. La hiperplasia de células paratiroides conlleva una disminución de la expresión de VDR o la disminución de su acción favorecida por la uremia y la hipocalcemia <sup>111</sup>. Recientemente se han descrito dos polimorfismos que juegan un papel importante en el HPTS asociado a la ERC. Bsm1 no solo tiene influencia en la producción de la PTH sino también en la respuesta de esta al calcitriol <sup>112,113</sup>. En pacientes con ERC estadio 4, la presencia del polimorfismo Bsm1 se asocia a niveles circulantes de calcitriol superiores y por tanto un HPTS menos severo <sup>113</sup>. Sin embargo, este polimorfismo se asocia a un mayor riesgo de HVI en pacientes con ERC no diálisis y ERC-HD <sup>114,115</sup>. Los sujetos portadores del polimorfismo Fok1 también

muestran niveles superiores de calcitriol circulantes independientemente del FG de los pacientes <sup>116</sup>.

El descubrimiento y tipificación del complejo FGF23/*Klotho* y FGFR ha permitido avanzar sustancialmente en el entendimiento del desarrollo, establecimiento y progresión del HPTS. El incremento de FGF23 es otro de los procesos adaptativos observados con el deterioro progresivo del FG con la finalidad de aumentar la excreción renal de fosfato <sup>117</sup> mediante el incremento de su excreción renal e indirectamente a través de la reducción en la producción de calcitriol y de la inhibición en la secreción de PTH <sup>82</sup>. Para llevar a cabo su función fisiológica, es primordial la unión de FGF23 al complejo receptor FGFR1-*Klotho* <sup>74</sup>. Al igual que sucede con otros complejos proteínicos en la ERC, *Klotho* disminuye progresivamente con el establecimiento de la ERC ocasionando una pérdida parcial del efecto de FGF23 sobre la excreción renal de fosfato <sup>118</sup>. A nivel de la glándula paratiroides, el complejo FGFR1/*Klotho* también disminuye, causando una pérdida de la inhibición en la secreción de PTH ejercida por FGF23 <sup>82,119,120</sup>. Adicionalmente, las glándulas paratiroides hiperplásicas incrementan la producción de la fosfatasa dual específica (Dusp) que ocasiona la desfosforilación de ERK1/2 que contribuye a la resistencia a la acción de FGF23 sobre la glándula paratiroides en estados de uremia <sup>121,122</sup>. Nuevas evidencias sugieren que el efecto inhibitor de FGF23 sobre la glándula paratiroidea también es mediado por un mecanismo independiente de *Klotho* y regulado al menos parcialmente por la vía NFAT dependiente de calcineurina que podría jugar un papel fundamental en la persistencia del HPTS en pacientes con ERC sometidos a trasplante renal ya que el uso de inhibidores de la calcineurina podría suprimir el efecto inhibitor de FGF23 sobre la producción de PTH <sup>123</sup>. Datos interesantes sugieren que FGF23 podría tener un efecto directo sobre la producción de PTH. En conjunto con la hiperfosfatemia persistente, FGF23 parece favorecer la proliferación de células paratiroides, reafirmando la importancia del control de los niveles de FGF23 en el tratamiento del HPTS <sup>124</sup>.

### 6.1.2 Desarrollo de Calcificaciones vasculares e HPTS

Una de las principales consecuencias de HPTS es el desarrollo de CV <sup>72,106,125</sup>. Sin embargo, el entendimiento de esta asociación solo se ha podido mejorar en la última década. De forma general, la aparición de CV deriva de la vía final común del HPTS. A día de hoy se han descrito diferentes tipos de CV, lo que la convierte en una manifestación patológica heterogénea. La aterosclerosis clásica en el contexto de cambios crónicos y degenerativos de las grandes arterias asociados principalmente a inflamación y dislipemia, la calcificación de Mönckeberg en el contexto de la hipertrofia de la capa media muscular de arterias, las calcificaciones valvulares y la arteriopatía calcificante asociada a uremia son los principales tipos descritos <sup>126-129</sup>. Estudios de experimentación animal en los que se ha inducido el desarrollo de CV han ayudado a incrementar el entendimiento actual de la fisio-patogenia de las CV. Estos modelos también han favorecido el estudio de potenciales medidas terapéuticas que consigan inhibir el desarrollo del proceso o bien su retroceso <sup>130</sup>. Estos estudios han logrado identificar factores de transcripción como el Cbfa-1/RUNX2 y la MSX-2 localizadas en la zona periférica a las calcificaciones en pacientes con ERC. Además, proteínas como la osteopontina, la sialoproteína ósea, el colágeno tipo I, la osteonectina y la fosfatasa alcalina también han sido encontradas en zonas de calcificaciones extra-esqueléticas <sup>131</sup>. A pesar de estos hallazgos, un porcentaje no despreciable de pacientes expuestos a los mismos factores de riesgo no desarrollan CV, sugiriendo la existencia de factores protectores que de alguna forma predominan en estos sujetos <sup>131-133</sup>.

Más allá de la existencia de factores de riesgo tradicionales modificables y no modificables como la edad avanzada, el tabaquismo, la obesidad, la diabetes, hipertensión o dislipemia, la presencia de factores de riesgo no tradicionales podrían explicar en gran medida las tasas de mortalidad desproporcionadas en pacientes con ERC <sup>72</sup>. Mención especial merece la etnia de los sujetos. Diferentes estudios han demostrado la gran variabilidad existente en los marcadores del metabolismo óseo mineral dependiendo de la etnia de los pacientes. Los descendientes europeos muestran niveles inferiores de calcitriol comparados con afroamericanos <sup>134,135</sup>. Estos últimos sin embargo, presentan

niveles superiores de fosfato sérico, PTH y una menor excreción de fosfato en orina <sup>135</sup>. Consecuentemente, la falta de resultados consistentes en relación a una mejoría en la supervivencia de los pacientes con ERC indica que la intervención de los factores de riesgo tradicionales no es suficiente, lo que sugiere la existencia de factores de riesgo no tradicionales que también deben ser intervenidos.

En esta línea, los factores de riesgo no tradicionales que merecen especial atención son aquellos relacionados con la ERC-EOM. El fosfato sérico incrementado activa el transportador de fosfato dependiente de sodio (Pit-1) a nivel de las células musculares lisas, iniciando un proceso metabólico de pro-mineralización <sup>136</sup>. A pesar de que parece previsible, el aporte oral de calcio no parece inducir el proceso de CV en la población general. Sin embargo, en pacientes en diálisis el uso de captadores de fosfato con contenido cálcico, así como la carga de calcio favorecida por las altas concentraciones de calcio en el líquido de diálisis se asocian a una mayor incidencia de calcificaciones en arterias coronarias <sup>63,137</sup>.

En relación a la PTH, múltiples estudios han asociado la presencia de HPTS y una mayor mortalidad en pacientes en HD. Más interesante es el hecho de que los estudios dirigidos a la disminución de la PTH y del control de HPTS no han mostrado resultados favorables consistentes a este respecto <sup>138,139</sup>. Sin embargo, análisis *post hoc* del estudio *EVOLVE* han demostrado que la reducción de los valores de PTH mediado por el cinacalcet, se asocia a un descenso de la mortalidad, si bien, este efecto es dependiente de los niveles de calcio, ya que aquellos sujetos con reducciones inferiores de las cifras de PTH y de FGF23 presentaban cifras más elevadas de calcio sérico <sup>44</sup>. Los sujetos que recibieron cinacalcet sufrieron un menor porcentaje de eventos cardiovasculares no ateroscleróticos incluyendo muerte súbita e insuficiencia cardíaca <sup>140</sup>. Adicionalmente, en un estudio donde solo se incluyeron sujetos de descendencia asiática, aquellos sometidos a paratiroidectomías por HPTS refractario mostraron un incremento en la supervivencia <sup>68</sup>.

Por otro lado, la ERC se asocia de forma muy estrecha a inflamación<sup>141-143</sup>. Actualmente, el proceso inflamatorio, el estrés oxidativo o los cambios en la señalización de la vía de la Wnt/ $\beta$ -catenina se catalogan como uno de los principales factores de riesgo no tradicionales asociado al desarrollo de CV<sup>144-146</sup>. El desarrollo de nuevas técnicas de diálisis ha permitido mejorar el proceso inflamatorio en pacientes en diálisis,<sup>147</sup> a pesar de lo cual la supervivencia solo ha mejorado moderadamente.

En relación a las zonas vasculares se pueden ver afectadas todas las arterias del árbol vascular si bien existe predilección por arterias iliacas, femorales<sup>148</sup> y coronarias. En relación a estas últimas se han encontrado afectadas en más del 95% de los pacientes en diálisis<sup>149</sup>. La relevancia de su identificación determina su capacidad para predecir el riesgo de hospitalización libre de eventos cardiovasculares, mortalidad de origen cardiovascular y de mortalidad en general<sup>148</sup>. Otra característica importante de las CV observadas en pacientes con ERC es que muestran una evolución acelerada comparada con otras poblaciones. Además, la composición de la placa de ateroma en pacientes con ERC se caracteriza por el escaso contenido de colágeno que podría relacionarse con un mayor riesgo de desestabilización de la placa<sup>150</sup>. Las causas de que este proceso sea acelerado en pacientes con ERC se desconocen con exactitud, pero se cree que puede estar relacionado con la mayor proporción de aterosclerosis y al envejecimiento prematuro característico de esta población. El proceso inflamatorio crónico<sup>143,151</sup>, el estrés oxidativo, las toxinas urémicas, las alteraciones del calcio/fosfato/PTH podrían ser factores aceleradores de este proceso<sup>73,144,152</sup>. El déficit de Fetuina A, muy frecuentemente encontrado en pacientes con ERC y diálisis, podría ser uno de los factores determinantes de la ECV acelerada mostrada por estos pacientes. Mientras que esta proteína no es esencial para la inhibición de las calcificaciones extra-óseas, su función inhibidora de la calcificación se ve amplificada en el contexto de alteraciones típicas del metabolismo óseo mineral. Algunos estudios sugieren que el déficit de Fetuina A se asocia a calcificación de la íntima y no de la capa media muscular encontrada en sujetos con ERC, sugiriendo que no juega un papel trascendental en la ECV acelerada de estos pacientes<sup>153</sup>.



Otras proteínas asociadas con la presencia de CV se comentan brevemente a continuación. Se desconoce de momento si actúan como factores acelerados del desarrollo de las CV en pacientes con ERC. La osteoprotegerina (OPG) y la esclerostina se incrementan con el deterioro de la función renal. Estas dos proteínas también se han asociado de forma independiente a la presencia de calcificaciones en arterias coronarias principalmente en pacientes con PTH baja. La OPG es un inhibidor de la osteoclastogénesis con un efecto antiresortivo. La esclerostina, por el contrario, es un inhibidor de la osteblastogénesis <sup>154</sup>. La proteína GLA de la matriz, (MPG), se secreta principalmente por células endoteliales y células del músculo liso vascular y actúa como inhibidor directo local de la precipitación y cristalización cálcica. Los ratones sin expresión de MPG desarrollan calcificaciones vasculares y valvulares extensas <sup>155</sup>. En la última década ha ganado relevancia dada su estrecha relación con el desarrollo de calcificaciones en pacientes bajo tratamiento con anticoagulantes cumarínicos. La acción de la MPG ejerce su efecto gracias a la carboxilación de la vitamina K. Los anticoagulantes cumarínicos inhiben la carboxilación de la vitamina K inactivando la MPG y favoreciendo al desarrollo de CV <sup>155,156</sup>.

## **6.2 FGF23**

Hasta hace poco más de una década, el eje PTH/Vitamina D sentaba las bases para el estudio y entendimiento de la homeóstasis del metabolismo óseo mineral. Sin embargo, el descubrimiento de factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF23) ha revolucionado el la ERC-EOM y en particular el de la homeóstasis del fosfato <sup>157,158</sup>.

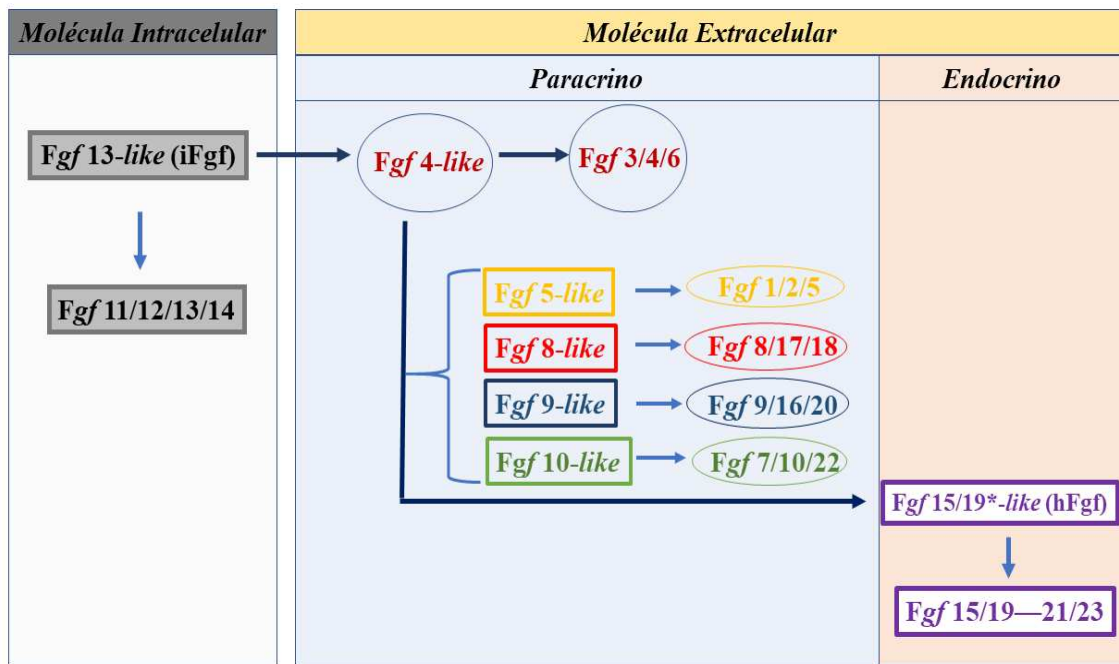
A día de hoy, FGF23, en conjunto con el hueso, el riñón y el eje PTH/vitamina D forman parte de un avanzado sistema de comunicación entre diferentes órganos. El reconocimiento de los osteoblastos y los osteocitos maduros como la principal fuente de producción de FGF23, ubica al hueso como un órgano endocrino con la habilidad de comunicarse con otros órganos relacionados o no con el mantenimiento de la homeóstasis óseo mineral.

Los factores de crecimiento fibroblástico (FGF) son proteínas de señalización que juegan un papel trascendental en el desarrollo y en el metabolismo <sup>159</sup>. El eje FGF23/hueso tiene como principal objetivo fisiológico la emisión de una señal fosfatúrica en un intento de corregir algunas alteraciones del metabolismo óseo mineral y proveer al organismo de una hormona contrarreguladora que mediante la disminución en los niveles circulantes de calcitriol protege al organismo de los efectos no deseados de la misma <sup>160</sup>.

#### 6.2.1 Origen y estructura de FGF23

La familia de factores de crecimiento fibroblástico está compuesta por 22 proteínas estructural y evolutivamente relacionadas (FGF1-FGF23). Es de destacar que, FGF15 y FGF19 no están incluidos en esta familia debido a que son proteínas ortólogas y se encuentran ausentes en humanos y en ratones respectivamente <sup>159,161,162</sup>. Todas las proteínas pertenecientes a esta familia derivan del gen ancestral *Fgf13-like* y conservan una estructura central de ~120 aminoácidos <sup>160</sup>. En conjunto, la familia FGF posee una gran variedad de funciones biológicas que van desde la regulación en el desarrollo embrionario, la organogénesis y el metabolismo <sup>163</sup>.

La familia de FGF puede ser dividida en 7 subfamilias filogenéticas que componen a su vez 3 grupos de acuerdo a su mecanismo de acción: intracelular (intracrinos) y extracelular [paracrinos (canónico) y endocrinos (hormonal)] (Figura 2). El grupo intracelular, actúan como moléculas de señalización de forma independiente al FGFR <sup>163</sup>. El grupo canónico está compuesto por 5 subfamilias que se unen y activan la tirosina quinasa del FGFR, actuando de forma autocrina y paracrina <sup>160</sup>. Por último, la subfamilia con funciones endocrinas, posee funciones endocrinas sistémicas a través de un mecanismo FGFR dependiente.

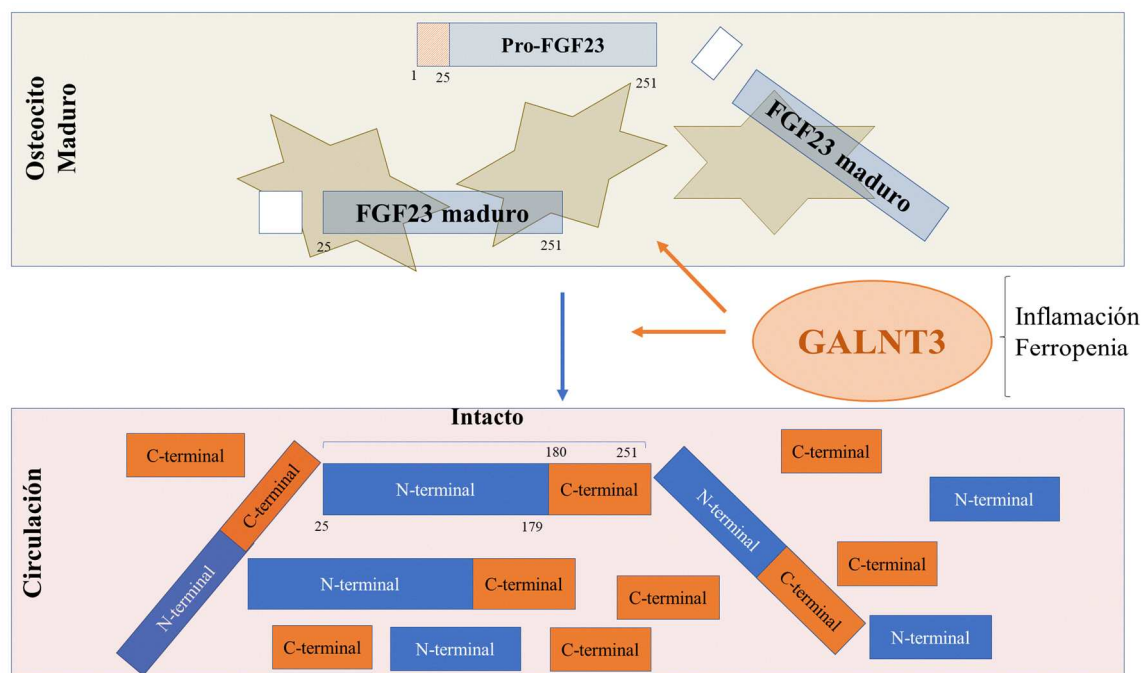


**Figura 2. Evolución funcional histórica del gen Fgf. Adaptado de Itoh y cols.<sup>162</sup>** *Fgf 4-like* se genera por duplicación génica de *Fgf 13-like*, el gen ancestral común. *Fgf 15/19-like* se generó por una duplicación local de *Fgf 4-like* de forma muy temprana en la evolución de los vertebrados. Ambos, *Fgf 15* y *Fgf 19* están ausentes en humanos y ratones respectivamente \*. *Fgf 21* y *Fgf 23* se generaron a partir de una duplicación a gran escala del genoma durante la evolución temprana de los vertebrados.

*Fgf 19/21/23* son genes específicos de vertebrados. A diferencia de la familia FGF canónica, que muestra sitios de unión heparina/heparan sulfato como cofactor, la subfamilia con funciones endocrinas adquirió estas características gracias a la sustitución de estos sitios de unión heparina/heparan sulfato por sitios de unión COOH terminal que permiten la activación de FGFR en ausencia de heparina<sup>162</sup>. Esta característica, además, le confiere la capacidad de no ser capturado en la matriz extracelular permitiendo su función como factores endocrinos circulantes. Como consecuencia, las proteínas FGF23 endocrinas requieren la existencia de cofactores que medien su acción a través de los FGFR y que determinen el efecto de FGF23 sobre un órgano específico<sup>164</sup>.

FGF23 es la proteína más estudiada de la familia de FGF con funciones endocrinas. Muestra una homología muy alta con FGF21, por lo que este último comienza a ser de interés clínico. Inicialmente, FGF23 se reconoció a nivel cerebral en el núcleo talámico

ventrolateral y su relevancia clínica estaba sustentada en pacientes con raquitismo hipofosfático autosómico dominante (ADHR), en el que la mutación del gen *Fgf23* le confería una resistencia a la proteólisis de la proteína intacta, incrementando sus niveles circulantes y por tanto la excreción renal de fosfato, osteomalacia, raquitismo, deformidades en extremidades inferiores, estatura baja, dolor óseo y malformaciones dentarias <sup>157</sup>. Este gen se localiza en el cromosoma 12p3.3. en seres humanos y 6 en roedores. Está compuesto de 3 exones separados por 2 intrones que codifican una glicoproteína intacta de 32-kDa con 251 aminoácidos que es catalogada como su forma biológicamente activa. Adicionalmente, la proteína conserva una porción *N-terminal* (20 kDa) y una porción COOH-terminal (*c-terminal*; 12 kDa) capaz de interactuar con  $\alpha$ -*Klotho* y que se libera tras la proteólisis de la proteína intacta actuando como cofactor de FGFR <sup>31,159</sup> (Figura 3). Tras la proteólisis de la secuencia de 24 aminoácidos y la glicosilación por parte de UDP-*N-acetil- $\alpha$ -D-galactosamina* (GALNT3), la proteína madura es secretada a la circulación periférica desde el osteocito. En la circulación periférica, FGF23 circula como dos formas principales: la forma intacta (iFGF23) y la forma COOH-terminal o cFGF23 de 73 aminoácidos (Figura 3). Una vez en la circulación sistémica o incluso a nivel intra-osteocitario en algunas circunstancias, iFGF23 es sometido a un proceso de proteólisis a nivel del dominio <sup>176</sup>RXXR<sup>179</sup>. En la actualidad, se acepta de forma general que la proteína intacta es la que exclusivamente conserva actividad biológica. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que fragmentos de cFGF23 podrían conservar actividad biológica, aunque con una potencia muy inferior comparado con iFGF23 <sup>33,165</sup>. Adicionalmente, cFGF23 es considerado esencial para la interacción con el cofactor  $\alpha$ -*Klotho*, aunque sin activar los FGFR bloqueando de forma competitiva el complejo *FGFR/Klotho*, inhibiendo el efecto biológico de la proteína intacta <sup>166</sup>.



**Figura 3. FGF23 es producido principalmente en osteocitos maduros y osteoblastos.** La molécula está compuesta por una región de 24 aminoácidos (recuadro blanco con líneas rojas), una región N-terminal de 154 aminoácidos y una región c-terminal compuesta por 73 aminoácidos. La glicosilación por la UDP-N-acetil- $\alpha$ -D-galactosamina transferasa 3 (GALNT3) permite la liberación de  $^{25}$ -FGF23- $^{251}$  maduro a la circulación donde FGF23 circula en dos isoformas medibles, iFGF23 y cFGF23. En algunas circunstancias, como en estados de ferropenia o inflamación, la glicosilación de FGF23 puede producirse dentro del osteocito.

### 6.2.2 Funciones de FGF23

Tal y como se ha comentado brevemente en apartados anteriores, FGF23 es una hormona fosfotrófica que regula la excreción renal de fosfato y la producción de calcitriol <sup>167</sup>. Estudios en ratones han demostrado que esta última función sobre la supresión de la 1  $\alpha$ -hidroxilasa (CYP27B1) es su efecto fisiológico primordial. Las vías de señalización intracelulares mediante las cuales FGF23 lleva a cabo esta función son escasamente conocidas. Los túbulos renales proximales son la principal zona de expresión de la 1  $\alpha$ -hidroxilasa. Sin embargo, tanto los túbulos proximales como los distales expresan el co-receptor  $\alpha$ -Klotho, así como también los FGFR 1, 3 y 4 <sup>168</sup>. La activación de los FGFR1c predomina en la mediación del efecto supresor de FGF23 sobre la síntesis de calcitriol. FGFR3 y FGFR4 también podrían participar en este proceso inhibitorio, aunque con un papel menos predominante <sup>169</sup>. Las vías de señalización a partir de los cuales se dirige

esta inhibición se conocen parcialmente. Reciente evidencia sugiere que el mecanismo mediante el cual FGF23 suprime la actividad de la 1  $\alpha$ -hidroxilasa, incluye la activación de señales extracelulares de las quinasas 1 y 2 (ERK1/2) <sup>170</sup>.

### 6.2.3 Klotho y receptores FGFR

La familia FGF con funciones endocrinas requiere la existencia de cofactores que faciliten su unión al FGFR, <sup>163</sup> aunque recientemente se ha demostrado que la acción de FGF23 sobre algunos órganos puede ser independiente de Klotho (Figura 4) <sup>54,57,171,172</sup>.  $\alpha$ -Klotho codifica una proteína transmembrana de 1,014 aminoácidos con actividad  $\beta$ -glucorinidasa y es expresado predominantemente a nivel renal, en el epitelio de los plexos coroideos a nivel cerebral y en glándula paratiroides <sup>173</sup> aunque también se ha documentado su expresión a nivel de la glándula pituitaria, placenta, musculo esquelético, vejiga urinaria, aorta, páncreas, testículos, ovarios, colon y células sinoatriales <sup>21,29,174</sup>. La ausencia de *Klotho* se considera un biomarcador precoz de ERC, de su progresión y de las complicaciones a largo plazo de la ERC como el desarrollo de CV e HVI <sup>118,175</sup>. Además, estudios en animales y en humanos sugieren que la ausencia de *Klotho* se asocia con resistencia a la acción de FGF23 <sup>160</sup>.

A diferencia de la forma transmembrana de *Klotho*, las funciones del *Klotho* soluble circulante son limitadas comparado con la proteína transmembrana. Esta forma soluble de *Klotho* (*sKlotho*) es producida a partir del desprendimiento del ectodominio extracelular de la proteína transmembrana mediante la acción de  $\alpha$ -secretasas, desintegrinas y metaloproteasas del tipo ADAM10 y ADAM17 y secretada a la circulación sistémica, liquido cerebroespinal y orina <sup>175,176</sup>. *sKlotho* actúa como factor humoral regulando múltiples glucoproteínas a través de receptores de membrana desconocidos hasta el momento. Dentro de sus acciones destacadas se encuentra la inhibición de la insulina y del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) y de inhibir la internalización de receptor de calcio de membrana (TRPV5), responsable de la reabsorción transepitelial de calcio a nivel renal <sup>177</sup>. Por otra parte, *sKlotho* potencia la

acción de calcitriol en la reabsorción renal e intestinal de fosfato mediante la estabilización de TRPV5 y TRPV6 respectivamente <sup>178</sup>.

Los receptores de FGF son codificados por 4 genes diferentes que van desde *Fgfr1* hasta *Fgfr4* <sup>163</sup>. Los FGFR son receptores tirosina quinasa que están compuestos de un dominio extracelular similar a inmunoglobulinas (D1-D3), un ligando de unión transmembrana y un dominio citoplasmático <sup>171</sup>. Las diferentes isoformas de FGFR difieren en su afinidad para ligandos específicos de FGF. Además, requieren la presencia de co-receptores que incrementen su afinidad por los diferentes FGFs. En el caso de la familia de FGFs con funciones paracrinas, este co-receptor es la heparina/heparan sulfato que además le confiere poca afinidad por FGF23 <sup>164</sup>. Por el contrario,  $\alpha$ -*Klotho* actúa como co-receptor de FGF23, incrementando su afinidad por los FGFRs hasta 20 veces <sup>166</sup>. La isoforma de FGFR1 predomina en los órganos diana clásicos de FGF23. Una vez expuestos a la presencia de FGF23, el complejo *FGFR*/ $\alpha$ -*Klotho* forman complejos heterodímeros que actúan mediante la señalización de la proteína-quinasa mitógena activada (*MAPK*), iniciando la activación de proteínas intracelulares como la *FRS2*, *Gab1*, *Shc*, *PLC* o la *STAT* <sup>160</sup>.

### **6.3 FGF23 y su efecto en diferentes órganos**

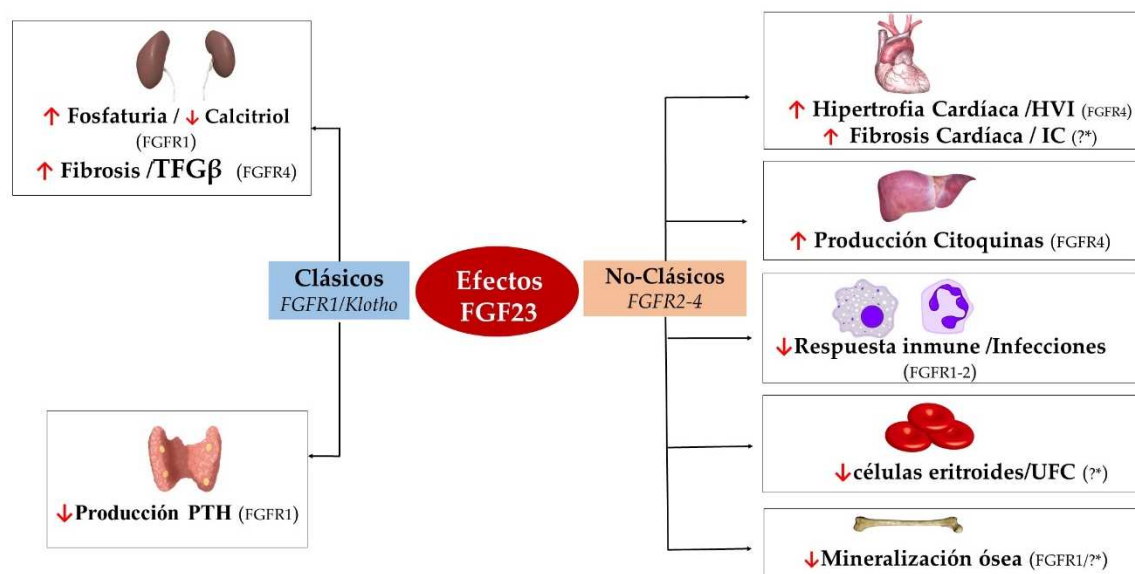
La existencia de FGFR en diferentes órganos, así como la presencia de  $\alpha$ -*Klotho* y *sKlotho* permite la activación de vías de señalización que conectan el hueso y a FGF23 con diferentes órganos (Figura 4). Los mecanismos moleculares clásicos y no-clásicos mediante los cuales se llevan a cabo estos efectos difieren principalmente en la existencia o ausencia de *Klotho* y del tipo de FGFR expresado por el órgano objetivo. A continuación, se resumen brevemente los efectos de FGF23 en los diferentes órganos.

#### **6.3.1 Riñón**

La principal función fisiológica de FGF23 se lleva a cabo a nivel renal mediante la contra regulación hormonal de la vitamina D <sup>179</sup>. La disminución de los niveles circulantes de la

1,25 (OH)<sub>2</sub> D son consecuencia de la inhibición de la 1  $\alpha$ -hidroxilasa y la estimulación de la 24-hidroxilasa. Ambos son efectos mediados a través del VDR <sup>180</sup>. Algunos estudios sugieren que el efecto de FGF23 sobre las diferentes hormonas reguladoras de la vitamina D podría variar en función de la duración de su estímulo <sup>181</sup>.

La expresión de FGFR1 predomina a nivel renal y es el principal responsable de mediar la acción inhibitoria de FGF23 sobre la regulación de la producción de formas activas de la vitamina D, aunque FGFR3 y FGFR4 también podrían mediar en menor medida este efecto <sup>169</sup>.



**Figura 4. Efecto de FGF23 sobre los diferentes órganos. Efectos clásicos y no clásicos. Adaptado de Rodelo-Haad C y cols. <sup>57</sup>.** Se describen en cada órgano el principal FGFR mediador de su efecto. HVI, hipertrofia ventrículo izquierdo; IC, insuficiencia cardíaca; PTH, hormona paratiroidea; TFGβ, factor transformador de crecimiento β; UFC, unidades formadoras de colonias eritroides. ?\* Presumiblemente independiente de *Klotho*.

El riñón es determinante en la homeóstasis del fosfato. El ajuste en la excreción de fosfato es dependiente de su ingesta que mantiene los niveles séricos dentro de un margen relativamente estrecho. Tras ser filtrado, el fosfato se reabsorbe casi en su totalidad a nivel del túbulo proximal renal mediante mecanismos transcelulares favorecido por la presencia de cotransportadores NaPi2. A nivel de túbulo proximal renal se han reconocido hasta el momento 3 tipos diferentes: los cotransportadores tipo 1 (NaPi1) que no median



el transporte de fosfato; los tipos 2 (NaPi 2) que incluye el subtipo a, b y c (NPT2a, NPT2b y NPT2c respectivamente; y finalmente el tipo 3 o PiT1 y Pit2. FGF23 ejerce su efecto fosfatúrico mediante la inhibición de los receptores NaPi 2a y NaPi 2c <sup>19,179,182</sup>.

### 6.3.2 Glándula Paratiroides

*α-Klotho* y FGFRs son expresados de forma abundante a nivel de la glándula paratiroides. FGF23 regula de forma negativa la producción y secreción de PTH <sup>29</sup>. Sin embargo, en pacientes con ERC, el desarrollo de HPTS se asocia clínicamente a niveles tanto de PTH como de FGF23 concomitantemente elevados. De hecho, un estudio realizado en pacientes en diálisis demostró que FGF23 predice el desarrollo de HPTS refractario <sup>53</sup>. Estudios recientes han demostrado que el efecto inhibitor de FGF23 sobre la glándula paratiroides se pierde en estados avanzados de insuficiencia renal debido a una disminución de la expresión de receptores FGFR y de *Klotho* a nivel de la glándula paratiroides <sup>82</sup>.

### 6.3.3 Corazón

Un alto porcentaje de pacientes con ERC desarrollan HVI, principalmente en estadios avanzados. Múltiples factores se han asociado al desarrollo de HVI como la hipertensión, la hiperfosfatemia e incluso la fistula arterio-venosa. Más recientemente, otro tipo de factores menos típicos también han surgido como determinantes del remodelado cardiaco <sup>183</sup>. FGF23 puede afectar el funcionamiento y estructura cardiaca de forma indirecta y directa. Indirecta mediante el incremento de comorbilidades asociadas a la ERC como la hipertensión y la aterosclerosis y directa mediante el efecto directo sobre la célula miocárdica. A diferencia de otros órganos en los que se requiere la presencia de un cofactor que permita la acción de FGF23, el corazón fue el primer órgano en el que pudo demostrarse el efecto de FGF23 de forma independiente a la existencia del cofactor *α-Klotho* ya que este no se expresa en células cardíacas <sup>54</sup>. La existencia del receptor FGFR del tipo 4 (FGFR4) permite la acción directa de FGF23 sobre los miocitos cardiacos favoreciendo la hipertrofia celular, el remodelado cardiaco, fibrosis y el advenimiento de

insuficiencia cardiaca (Figura 4) <sup>54,172</sup>. Este efecto ha podido ser inhibido en experimentos animales mediante la inyección de agentes bloqueantes de los FGFR4 o inhibidores de la calcineurina <sup>172,184</sup>. Por otro lado, el déficit de *Klotho* observado en la ERC también se ha asociado a daño cardiaco independiente a los niveles circulantes de FGF23 <sup>185,186</sup>. Por tanto, debido a que la ERC se acompaña de eventos fisiopatológicos como al hiperfosfatemia, inflamación y acumulación de productos nitrogenados, todos ellos también relacionados con el daño miocárdico, sugiere que los cambios asociados a FGF23 y al déficit de *Klotho* son aditivos y no completamente excluyentes entre sí. Debido a que algunos estudios han demostrado que el efecto de FGF23 sobre la célula cardiaca es observable tras solo 5 días de exposición a concentraciones elevadas de FGF23, <sup>54</sup> otros estudios sugieren que la duración de esta exposición, situación evidente en pacientes con ERC, más que la concentración de FGF23 circulante es la responsable de las alteraciones descritas a nivel cardiaco atribuibles a FGF23 <sup>187</sup>. La forma biológicamente activa de FGF23 también es expresada por miocitos cardiacos lo que podría sugerir la existencia de un efecto paracrino <sup>188</sup>. De hecho, recientemente se ha demostrado que la HVI se asocia al incremento de FGF23 de origen cardíaco <sup>189</sup>.

Un dato muy relevante no solo demostrado en animales sino también en humanos es el incremento de la expresión de FGFR4 y de la calcineurina asociado a la ERC <sup>172,188</sup>. De hecho, la expresión de FGFR4 se correlaciona con el FG, la modalidad de TRR y con el tiempo que el paciente ha permanecido en diálisis. La sobreexpresión de FGFR4 se correlaciona con el tamaño de los miocitos tras el desarrollo de la HVI soportando el potencial efecto paracrino de FGF23 sobre la célula miocárdica <sup>188</sup>. Más allá del efecto hipertrófico sobre la célula cardiaca, FGF23 también se asocia a un incremento en la expresión de factores pro-fibróticos y de citoquinas inflamatorias que expanden el daño miocárdico <sup>171,190</sup>. Se desconoce con precisión el mecanismo mediante el cual FGF23 induce los cambios reseñados a nivel cardiaco, pero la evidencia actual sugiere que FGFR4 interactúa directamente con PLC $\gamma$ , la calcineurina y NFAT <sup>171,185</sup>.

La activación de FGFR4 por arte de FGF23 a nivel cardiaco también se ha asociado a un incremento del calcio citoplasmático lo que por un lado podría mejorar la contractilidad

cardíaca, y por el otro favorecer la aparición de arritmias cardíacas <sup>191</sup> posicionando a FGF23 no solo como un marcador pasivo sino como un actor principal del desarrollo de HVI <sup>183</sup>.

La existencia de este mecanismo de estimulación cardíaca a través de FGFR4 independiente de *Klotho*, ha despertado el interés acerca de la posibilidad de no solo revertir la HVI asociada a FGF23 sino también inhibir la progresión de la cardiopatía hipertrófica ya establecida <sup>171</sup> sin afectar el resto de funciones biológicas de FGF23 sobre otros órganos. Recientemente, otro estudio desafiando la evidencia reseñada anteriormente, ha demostrado que el efecto de FGF23 circulante sobre el desarrollo de HVI es dependiente de la existencia de ERC <sup>192</sup>.

#### 6.3.4 Hígado

La abundante presencia de FGFR4 a nivel hepático soporta la evidencia del efecto de FGF23 sobre el tejido hepático <sup>21,182,193</sup>. En similitud al mecanismo de activación cardíaco, a nivel hepático, la vía de señalización incluye la interacción entre FGFR4/PLC $\gamma$ /calcineurina y NFAT a partir de la cual la estimulación de FGF23 induce la producción hepática de *hs*-CRP e IL-6 <sup>55</sup>. La producción de estas citoquinas mediado por FGF23 también puede ser inhibida mediante la utilización de bloqueantes específicos del FGFR4 al igual que sucede a nivel cardíaco <sup>194</sup>. Las células de Kuffer, un tipo de macrófagos especializados, son responsables en gran medida de la producción de citoquinas inflamatorias a nivel hepático. Estudios en cultivos de macrófagos han demostrado que estos responden a FGF23, por tanto, es posible que el efecto de FGF23 sobre los hepatocitos este mediado por la acción previa de FGF23 sobre las células de Kuffer <sup>195</sup>. Se desconoce si el efecto de FGF23 sobre las células de Kuffer confiere un efecto protector, ya que la producción de citoquinas inflamatorias por estas células favorece la proliferación hepatocitaria <sup>171</sup>. Sin embargo, la existencia de la vía de señalización calcineurina/NFAT, también responsable de la producción de citoquinas a nivel hepático, invita a pensar que la producción de citoquinas inflamatorias favorecidas

por la interacción de estas vías de señalización con FGF23, inducen la producción de citoquinas a nivel sistémico y no exclusivamente a nivel hepático <sup>171</sup>.

La ERC se asocia a un incremento de FGF23 y de citoquinas inflamatorias. En la misma línea, FGF23 ha demostrado ser capaz de estimular la producción de citoquinas inflamatorias y de reactantes de fase aguda. De hecho, actualmente se considera que el incremento de FGF23 es uno de los principales mediadores del proceso inflamatorio sistémico observado en pacientes con ERC. Todos los factores anteriormente mencionados, la ERC, FGF23 y la inflamación sistémica, se asocian a una mayor morbilidad y mortalidad. Consecuentemente, el correcto entendimiento y abordaje de este trinomio, es esencial para establecer aproximaciones terapéuticas que reduzcan la elevada morbimortalidad observada en estos pacientes.

#### 6.3.5 Sistema inmunitario

La uremia induce un estado de disfunción inmunitaria tanto innata como adquirida <sup>196</sup>. De hecho, la incidencia de infecciones en pacientes con FRA y ERC es superior a la observada en la población general <sup>197-199</sup>. Aunque los mecanismos responsables de este estado de disfunción inmunitaria son variados, recientemente se ha descrito el papel fundamental de FGF23 como predictor de un mayor porcentaje de infecciones en pacientes con ERC <sup>56,197</sup>.

La activación y migración de neutrófilos se encuentra dentro de los principales mecanismos responsables de la defensa contra agentes externos agresores. Estudios previos han demostrado que los cambios adaptativos a la ERC contribuyen a la disfunción de neutrófilos <sup>200,201</sup>. En esta línea, mediante la inactivación de citoquinas y de  $\beta$ 2-integrinas capaces de inhibir la activación, adhesión y la migración transendotelial de neutrófilos, FGF23 tiene la capacidad de reducir la capacidad de los neutrófilos de responder a agentes infecciosos externos <sup>56</sup>. Recientemente, otros estudios han demostrado que FGF23 reduce la expresión del marcador CD11b, expresado no solo en neutrófilos sino también en células natural killer, macrófagos, granulocitos y células de

medula ósea, y que regula la adhesión leucocitaria, así como también disminuye la capacidad de quimiotaxis propia de los neutrófilos <sup>171,202,203</sup>.

Al igual que sucede en otros órganos, este mecanismo hasta el momento ha sido demostrado ser independiente de *Klotho* y mediado por FGFR2, el único expresado a nivel de la superficie celular, mientras que FGFR3 y FGFR4 lo hacen a nivel citoplasmático <sup>204</sup>. A diferencia de otros órganos, se ha sugerido que el efecto de FGF23 sobre el funcionamiento de neutrófilos es dependiente de su concentración, de tal forma que a mayores niveles circulantes de FGF23, mayor es el impacto sobre la capacidad inmunitaria de los neutrófilos. Datos adicionales sugieren que FGF23 también parece tener un efecto inhibitor sobre los monocitos y por tanto en su capacidad para producir 1,25 (OH)<sub>2</sub> D mediante la desregulación de la 1- $\alpha$  hidroxilasa <sup>205</sup>. Este hecho, podría explicar el mayor porcentaje de muertes por infecciones de pacientes en diálisis <sup>197</sup>. El efecto regulador positivo de FGF23 sobre los macrófagos, favoreciendo la producción de TNF $\alpha$ , podría ser otro de los responsables del proceso inflamatorio sistémico observado en pacientes con ERC y que ensombrece su pronóstico <sup>195</sup>. De forma interesante, en el caso de monocitos y macrófagos, estos expresan FGFR1, lo que sugeriría que el efecto de FGF23 sobre las células inmunitarias incluiría vías tanto dependiente de *Klotho* como independientes de *Klotho* <sup>171,205</sup>.

#### 6.3.6 Hueso

Un estudio reciente sugiere que FGF23 es un potente supresor de la transcripción de la fosfatasa alcalina no específica (TNAP) en los osteocitos y que este efecto es independiente de *Klotho* <sup>206</sup>. Debido a que la TNAP es crucial en el proceso de mineralización ósea, es de esperar que los niveles elevados de FGF23 se asocien a un descenso de la mineralización osteoide por pérdida de la inhibición del pirofosfato secretado por los osteoblastos <sup>207</sup>.

La expresión de  $\alpha$ -*Klotho* a nivel óseo es escasa <sup>21</sup>. Consecuentemente, el efecto del FGF23 sobre la inhibición de la mineralización puede ser independiente de *Klotho*. A este respecto, existe evidencia contradictoria ya que la utilización de inhibidores

específicos de FGFRs, reveló que FGF23, mediante la estimulación de FGFR3, es capaz de regular la mineralización ósea de forma independiente a calcitriol y *Klotho* <sup>206</sup>. Sin embargo, estos datos han sido debatidos por otro estudio que demostró que FGF23 suprime de forma directa la mineralización ósea mediante la activación del complejo *FGFR1/Klotho* <sup>208</sup>. En esta línea, la delección de *Klotho* en osteocitos incrementa la formación y la masa ósea <sup>209</sup>. Otro estudio reciente, demostró que la presencia de osteocitos productores de FGF23 podría proteger al hueso del efecto deletéreo inducido por la ERC <sup>210</sup>. Por tanto, estudios futuros deben determinar si el efecto de FGF23 sobre la mineralización ósea utiliza ambas vías de señalización y cuáles son los factores que determinan la vía mediadora preferente.

#### 6.3.7 Anemia

Existe una estrecha relación entre las anomalías en el metabolismo del hierro y la anemia con el incremento de FGF23 <sup>48</sup>. Por el contrario, FGF23 tiene efectos directos sobre la producción de eritropoyetina <sup>211,212</sup>. En pacientes con ERC, FGF23 es predictor del desarrollo de anemia y del descenso en los niveles de Hb <sup>213,214</sup>. Hasta el momento, no existe evidencia de que *Klotho* se exprese a nivel de la médula ósea, por tanto, se presume que las vías de señalización a través de las cuales FGF23 ejerce estos efectos son independientes de *Klotho*, aunque estas tampoco se conocen con exactitud <sup>215</sup>.

#### 6.3.8 Otros

Diferentes efectos de FGF23 se han descrito sobre otros órganos que, sin embargo, deben ser mejor tipificados. Es bien conocido que, a nivel cerebral, se ha descrito la presencia de FGFRs y de *Klotho* a pesar de lo cual el efecto de FGF23 sobre los diferentes tipos de células cerebrales es sombrío <sup>171</sup>. Un estudio ha sugerido que el incremento de FGF23 se asocia a la disminución de la densidad sináptica en ausencia de *Klotho* lo que podría afectar el aprendizaje espacial y la memoria, esta última situación altamente prevalente en pacientes con ERC <sup>216</sup>. Sin embargo, parece que este efecto se anula tras la ingesta de

un alto contenido de fosfato en la dieta, lo que podrían desafiaría la hipótesis del efecto directo de FGF23 sobre las células cerebrales.

Otro punto interesante a profundizar es el efecto potencial de FGF23 sobre el músculo estriado, considerando su efecto a nivel cardíaco. La disminución de la fuerza muscular y el acortamiento de sarcolema son frecuentes en pacientes en diálisis <sup>171,217</sup>. Estos datos, han sido corroborados en estudios animales en los que tras inducir un incremento de FGF23, se ha observado disminución de la fuerza muscular <sup>218</sup>. FGFR4 se expresa a nivel muscular donde además se le han conferido funciones reguladoras en la diferenciación miogénica y regeneración muscular esquelética que en algunas situaciones podría generar crecimientos descontrolados con la generación de tumores musculares <sup>219,220</sup>.

Existe una relación estrecha entre la función pulmonar, renal y cardíaca. <sup>171</sup> Todos los diferentes FGFR se expresan a nivel pulmonar, aunque predominan los FGFR4. Consecuentemente, es absolutamente factible un potencial efecto de FGF23 sobre este órgano. Sin embargo, existe poca evidencia del efecto de FGF23 sobre el tejido pulmonar. Esta evidencia podría ser resumida en el efecto de FGF23 sobre las células epiteliales bronquiales, promoviendo producción de IL-8 y la expresión de FGFR1, por lo que la vía de activación es *Klotho* dependiente <sup>221</sup>. Se requieren más estudios que demuestren los efectos protectores o deletéreos que puedan tener FGF23 y *Klotho* a nivel pulmonar <sup>171</sup>.

A nivel endotelial, se desconoce con claridad si FGF23 podría tener un efecto directo sobre su estructura y funcionamiento <sup>171</sup>. Datos contradictorios publicados en los últimos años sugieren que FGF23 podría inducir un incremento del estrés oxidativo y de la expresión de moléculas de adhesión asociadas con la disfunción de su funcionamiento <sup>222,223</sup>. A pesar de que *Klotho* ha demostrado proteger la célula endotelial del envejecimiento inducido por la uremia, <sup>224</sup> otros estudios han demostrado que FGF23 no induce la calcificación vascular <sup>225</sup>. Es probable que este efecto dependa del tipo de célula a la cual van dirigida el ataque por parte de FGF23. Próximos estudios deben determinar si el efecto de FGF23, depende de su acción sobre las células del músculo liso de la íntima media vascular.

## **6.4 Regulación de FGF23**

A lo largo de los últimos 20 años, tras el descubrimiento de FGF23, varios son los factores asociados con su regulación. A continuación, se discutirá brevemente la evidencia actual en relación a los principales reguladores de FGF23.

### **6.4.1 Vitamina D**

A nivel sistémico, la vitamina D es el principal regulador de FGF23. De hecho, la administración de vitamina D exógena se asocia al incremento de FGF23 tanto en ratones como en humanos <sup>65,226</sup>. El calcitriol actúa a nivel intestinal incrementando la absorción de fosfato y calcio. El consecuente incremento de calcio sérico inhibe la producción de PTH, seguido por una disminución en la excreción de fosfato mediada por la PTH, lo que en teoría incrementaría el balance positivo de fosfato que es contrarrestado por FGF23, que, por un lado, incrementa la excreción de fosfato y por otro regula de forma negativa la producción de calcitriol. Recientemente, nuevos estudios han demostrado que la vitamina D circulante regula la producción de FGF23 mediante la sobreexpresión del VDR y de la estimulación del gen transcriptor independientemente de los niveles del calcio y fosfato <sup>227</sup>. La conversión local a nivel del hueso de calcidiol a calcitriol, incluso con niveles circulantes de calcitriol dentro de límites normales, también regula la producción de FGF23 <sup>227</sup>. Lo que demuestra que la regulación de FGF23 por parte de la vitamina D es dependiente e independiente de VDR.

### **6.4.2 Fosfato**

A día de hoy, a pesar de que el fosfato es reconocido como uno de los principales reguladores de la producción de FGF23, se desconoce el mecanismo mediante el cual el hueso reconoce las vías de activación relacionadas. A diferencia de algunos organismos primitivos en los que se ha logrado identificar proteínas de membrana celular que regulan los niveles intracelulares de fosfato <sup>228,229</sup>, en mamíferos estos mecanismos son



desconocidos. En estos, las concentraciones séricas de fosfato se mantienen dentro de un rango estrecho (2.5—4.5 mg/dl en humanos) mediante el control de la ingesta, absorción intestinal, liberación desde el hueso mediante la acción de la PTH y la excreción renal. En ratones, los niveles elevados de fosfato incrementan los niveles de FGF23, sin embargo, comparativamente, este efecto es inferior si lo comparamos con el del calcitriol<sup>230</sup>. En humanos, se han observado resultados conflictivos. Mientras que un estudio mostró que FGF23 era regulado por el fosfato sérico, otro estudio observó que, tras la ingesta de una dieta alta en fosfato, los niveles de FGF23 descendieron<sup>231,232</sup>. Estudios posteriores, han demostrado que, en sujetos sanos, la exposición a una dieta alta en fosfato se asoció a un incremento de FGF23<sup>233</sup>. En pacientes con ERC, los niveles de fosfato sérico se asocian a un incremento de FGF23<sup>40,234</sup>. Resultados similares se han observado en pacientes en diálisis en los que existe una correlación directa entre los niveles de fosfato sérico y FGF23,<sup>235</sup> si bien el descenso en los niveles de fosfato en esta población no se ha asociado a un descenso de FGF23<sup>236</sup>, sugiriendo que los niveles séricos de fosfato no reflejen de forma precisa el balance de fosfato y que sea la carga total de fosfato la responsable del incremento o descenso de FGF23. Por otro lado, la hiperfosfatemia se ha asociado a un incremento de citoquinas inflamatorias,<sup>237</sup> por lo que el estudio de esta relación nos podría brindar nuevas evidencias para entender mejor el impacto del incremento en los niveles de fosfato sérico y del proceso inflamatorio de los pacientes con ERC. Finalmente, debido a la estrecha relación entre los niveles de fosfato sérico y FGF23, y los potenciales beneficios en los que se podría traducir su reducción, es de vital importancia la creación de aproximaciones terapéuticas que conlleven a una disminución en sus niveles séricos.

#### 6.4.3 Calcio y PTH

La existencia de vías de señalización bidireccional entre FGF23 y la PTH ya se describió en apartados anteriores. Esta relación puede ser resumida brevemente en que los niveles elevados de PTH favorecen el incremento de FGF23 que a su vez regula de forma negativa la producción y secreción de PTH. A día de hoy, la capacidad que tiene la PTH en inducir un incremento de FGF23 está claramente establecido<sup>238</sup>.

La PTH tiene la capacidad de inducir in vitro la expresión del gen de FGF23, incrementando sus niveles séricos <sup>28</sup>. Diferentes estudios han demostrado el mecanismo de acción que puede ser directo o indirecto. Por un lado, se ha demostrado que el efecto de la PTH sobre los niveles de FGF23 es dependiente de calcitriol ya que, ratas sometidas a paratiroidectomía experimentan un descenso en los niveles de calcitriol, que se restablecen una vez se suplementa de forma exógena la PTH. Este incremento en calcitriol tras la infusión de PTH exógena podría inducir el incremento de FGF23 condicionado por niveles bajos de PTH <sup>46</sup>. Además, en ausencia de hiperfosfatemia, la PTH no tiene capacidad de inducir un incremento de FGF23 por sí misma, quizás por una reducción en la actividad de los osteocitos productores de FGF23 que requieren el influjo de la PTH para su normal funcionamiento <sup>46</sup>.

Recientemente, los mecanismos directos mediante los cuales la PTH favorece el incremento de FGF23 han quedado al descubierto con la descripción del receptor huérfano nuclear (Nurr1) <sup>45</sup>. Este receptor, es uno de los tres miembros de la familia de los factores inducibles de crecimiento nervioso (NR4A) y es objetivo directo de la acción de la PTH incrementando la osteopontina y la osteocalcina <sup>239</sup>. Adicionalmente, la PTH incrementa la expresión de este receptor que a su vez activa de forma directa la producción de FGF23 <sup>45</sup>.

Lo anterior soporta la idea de que la PTH es absolutamente necesaria para la producción de FGF23. De hecho, la falta de estimulación en la producción de FGF23 por parte del fosfato en ausencia de PTH parece sugerir que, en este contexto, la PTH podría ejercer un efecto prevalente sobre la estimulación de osteocitos productores de FGF23. En estados en los que la PTH se encuentra incrementada, el efecto de esta sobre la producción de FGF23 parecer ser independiente de calcitriol <sup>46</sup>. En pacientes en diálisis, aunque algunos estudios han demostrado la existencia de una correlación entre los niveles circulantes de FGF23 y la PTH, parece que esta correlación es regulada por el efecto del calcio y del fosfato <sup>235</sup>.

El calcio, estrechamente relacionado con el control de la PTH, también posee capacidad para regular los niveles circulantes de FGF23 <sup>42,43</sup>. Los mecanismos son diversos, de tal

forma que en estudios en ratas modificadas para la nula expresión del VDR, FGF23 se incrementaba tras la exposición a una dieta con alto contenido de calcio, sugiriendo que este mecanismo es independiente del VDR <sup>240</sup>. Otro estudio, demostró que la hipocalcemia inhibe la producción de FGF23, en un intento de disminuir el efecto regulador negativo de este sobre la producción de vitamina D que conlleve a una mayor supresión de niveles de calcitriol circulantes y que se traduzca en un empeoramiento de la hipocalcemia <sup>43</sup>. Este efecto era producido a pesar de niveles elevados de PTH. Este estudio también demostró la existencia de un umbral a partir del cual el calcio sérico promueve o inhibe la producción de FGF23. Es importante resaltar, que estos cambios parecen ser dependiente del tiempo de exposición a altas concentraciones de calcio, ya que estudios que han intentado reproducir estos resultados induciendo cambios agudos en la concentración de calcio sérico no han logrado demostrar los mismos resultados <sup>241</sup>. Se ha demostrado, que debido a la capacidad que tienen las altas concentraciones de calcio en inducir la activación del gen promotor de FGF23 a nivel osteoblástico, la inhibición de los canales de calcio con bloqueantes de los canales de calcio como el Nifedipino se traduce en una inhibición en la liberación de FGF23 <sup>242</sup>.

El CaSR constituye en principal receptor para el reconocimiento y mantenimiento de los niveles de calcio. Además, constituye el mecanismo de acción mediante el cual, los calcimiméticos reducen los niveles de PTH. Estudios en animales con una expresión nula de PTH y CaSR demostraron que el calcio tiene la habilidad de estimular la producción de FGF23 de forma independiente al CaSR. Además, también parece existir un umbral dependiente de fosfato a partir del cual el calcio puede ejercer sus efectos sobre FGF23. En contraposición, el efecto del fosfato sobre la producción de FGF23 es abolido cuando los niveles de calcio descienden por debajo de 8 mg/dl <sup>243</sup>.

En pacientes con ERC, la dieta rica en calcio y fosfato se ha asociado a un incremento de FGF23 <sup>233</sup>. Estos resultados fueron corroborados en un estudio sobre hombres y mujeres sanas en donde se demostró que una dieta alta en calcio incrementaba el riesgo de niveles elevados de FGF23 en 4 veces <sup>244</sup>.

#### 6.4.4 Inflamación y ferropenia

La inflamación es una respuesta fisiológica a la agresión de agentes externos. Se caracteriza por la liberación de citoquinas que incrementan o atenúan la respuesta inflamatoria. La perpetuación a lo largo del tiempo del proceso inflamatorio, suele producir efectos deletéreos para el organismo. Diferentes situaciones han sido asociadas al desencadenamiento del proceso inflamatorio. La inflamación tiene un papel directo sobre la producción de FGF23. El proceso inflamatorio sistémico altera el metabolismo mineral por varias vías y es variable dependiendo de si el estímulo es agudo o crónico. Mientras que la inflamación aguda puede generar efectos tanto anabólicos como catabólicos sobre el hueso promoviendo la formación y reabsorción ósea, la inflamación crónica se caracteriza por una disminución en la densidad mineral ósea mediada por una resorción ósea desmesurada<sup>245–247</sup>. Adicionalmente, la inflamación está relacionada con la hiperfosfatemia y la vitamina D ya que los niveles elevados de fosfato favorecen la producción de citoquinas inflamatorias y esta a su vez favorece la disminución de los niveles de calcitriol<sup>237</sup>. Este efecto se ve bloqueado tras la administración de captores de fosfato capaces de descender los niveles de fosfato sérico<sup>248</sup>. El establecimiento de esta relación es de vital importancia puesto que ambos se asocian de forma independiente a una mayor mortalidad en pacientes con ERC<sup>49,52,249–251</sup>.

Hace algunos años, varios estudios ya habían demostrado la existencia de una correlación entre FGF23 y algunas citoquinas inflamatorias<sup>251,252</sup>. Sin embargo, estos estudios no demostraban causalidad. En esta línea, un estudio ha demostrado que la inducción de inflamación, no solo se asocia a un incremento de la producción de FGF23 sino también a su proteólisis, lo que se traduce en niveles circulantes de cFGF23 elevados mientras que los de iFGF23 se mantenían inalterados<sup>48</sup>. La cronificación de este proceso inflamatorio, favorece el incremento simultáneo de ambas moléculas, iFGF23 y cFGF23<sup>48</sup>. Adicionalmente, la inflamación podría incrementar la producción de FGF23 de forma indirecta. Debido al efecto resortivo provocado por la inflamación a nivel óseo, la liberación de calcio y fosfato podría contribuir a una mayor producción de FGF23 una vez son liberados a la circulación sistémica<sup>253</sup>. Sin embargo, el mecanismo indirecto más

relevante mediante el cual la inflamación regula la producción de FGF23 esta mediado por el déficit de hierro. Este déficit de hierro, bien sea real o funcional, se asocia no solo al incremento en la producción de FGF23 sino también a su proteólisis <sup>254</sup>. Una vez los niveles de hierro eran restablecidos mediante la infusión exógena, los niveles de FGF23 se normalizaron <sup>254</sup>. La evidencia sugiere, que el mecanismo mediante el cual el déficit de hierro favorece el incremento de FGF23 es mediado por el factor inducible por hipoxia (HIF)-1 $\alpha$ . La ferropenia, así como la IL-1 $\beta$ , inducen el incremento de HIF-1 $\alpha$  que actúa a nivel de osteoblastos y osteocitos promoviendo la producción de FGF23 <sup>48</sup>.

Finalmente, se debe resaltar, que esta relación entre inflamación y FGF23 es bidireccional, ya que FGF23, mediante su anclaje con los FGFR4 a nivel hepático, induce la producción y liberación de citoquinas inflamatorias <sup>55</sup>.

#### 6.4.5 Eritropoyetina

A día de hoy, existen pocos estudios que sustenten esta asociación. Sin embargo, la evidencia existente es contundente. Al igual que sucede con la ferropenia, FGF23 se relaciona de forma bidireccional con la EPO. Mientras que estudios previos han demostrado que FGF23 inhibe la producción de EPO por parte de las células de la médula ósea<sup>211</sup>, la EPO tanto endógena como exógena, no solo incrementa su transcripción sino también su proteólisis <sup>255,256</sup>. El mecanismo mediante el cual se produce esta estimulación se desconoce. De momento, se cree que es independiente de los niveles de hierro. En pacientes con FRA secundario a sepsis, que requirieron la administración de EPO, se observó un incremento de FGF23 <sup>255</sup>. Estos resultados también fueron reproducidos en pacientes en HD y trasplantados renales <sup>213,257</sup>.

#### 6.4.6 Otros

##### 6.4.6.1 Adiponectina

Actualmente, el tejido adiposo también se reconoce por su alta capacidad para la producción de sustancias con funciones endocrinas. La adiponectina posee funciones

citoprotectoras y de incremento a la sensibilidad de la insulina, pero sus niveles se ven severamente reducidos en estados de obesidad. En contraposición, la ERC es una de las causas junto con la osteoporosis que se caracteriza por el incremento en sus niveles séricos. De hecho, estudios animales han descrito su capacidad para conferir protección al daño crónico renal actuando sobre las células epiteliales tubulares <sup>258</sup>. Recientemente, se ha demostrado que la adiponectina incrementa la pérdida de densidad mineral ósea y la excreción renal de calcio. Además, favorece el descenso en la expresión renal de  $\alpha$ -*Klotho* mediado por receptores ADIPOR1 y ADIPOR2 y a nivel óseo, reduce la producción de FGF23 por parte de los osteocitos <sup>259</sup>. Futuros estudios deberán aclarar los efectos a largo plazo de esta interacción en humanos.

#### 6.4.6.2 Insulina

De forma general, la presencia de DM se ha asociado a un incremento de los valores circulantes de FGF23, aunque la evidencia no es consistente <sup>260,261</sup>. Por otro lado, la insulina o el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) dependiente de la fosfoinositina 3 quinasa (PI3K/PKB/Akt/FOXO 1) parecen estar relacionados con la supresión de la producción de FGF23 <sup>262</sup>. La carga oral de glucosa en pacientes con déficit de vitamina D sugiere que el hueso tiene la capacidad de responder rápidamente disminuyendo la concentración de FGF23 <sup>263</sup>. Sin embargo, los niveles elevados de FGF23 favorecen la aparición de resistencia a la insulina primordialmente en población sin ERC <sup>260</sup>.

#### 6.4.6.3 Aldosterona

Debido a que FGF23 regula la expresión del cotransportador Sodio/Cloro (NCC) a nivel del túbulo distal que favorece la reabsorción tubular de sodio a través de la vía de estimulación clásica mediada por FGFR1/ $\alpha$ -*Klotho*/ERK, se ha asociado no solo a la regulación del sodio, sino también a la sobrecarga de volumen y la aparición de HTA <sup>264</sup>. Recientemente se ha demostrado que la aldosterona favorece la secreción de FGF23 <sup>265</sup> y este a su vez incrementa la expresión y secreción de angiotensina II (ATII) en cardiomiocitos, lo que demostraría otra vía mediante el cual FGF23 favorece la aparición

de HVI <sup>266</sup>. Finalmente, en pacientes en HD, la sobrecarga de volumen también parece asociarse al incremento de FGF23 <sup>267</sup>. La existencia de esta asociación ha incrementado el interés sobre FGF23 como objetivo terapéutico.

#### 6.4.7 Reguladores locales óseos

Los principales reguladores locales óseos de FGF23 son el gen regulador de fosfato con homología al cromosoma X (PHEX) y la proteína matricial de la dentina (DMP1). PHEX es una proteína de 106 kDa miembro de la familia de enzimas convertidoras de endotelina y que se expresa principalmente en osteocitos y osteoblastos. La inhibición de PHEX se traduce en un incremento en la producción de FGF23. Lo contrario sucede cuando se logra sobreactivar este gen. A día de hoy, los mecanismos mediadores de esta regulación se desconocen y aunque se ha sugerido que su principal función reguladora se lleva a cabo mediante la inducción de la proteólisis de FGF23, otros estudios no han logrado confirmar estos hallazgos <sup>29,268</sup>.

DMP1, una proteína de 94 kDa pertenece a una familia de proteínas de matriz extracelular que también se expresa al igual que PHEX en osteocitos y osteoblastos. La inhibición de DMP1 también se asocia al incremento de FGF3. Adicionalmente, DMP1 regula el proceso de mineralización de la matriz extracelular <sup>269</sup>. Sin embargo, a diferencia de PHEX, el incremento de DMP1 en ratones no se asocia a un descenso de FGF23 probablemente porque este no regula de forma directa la transcripción de *Fgf23* <sup>160</sup>.

Recientemente, se han descubierto vías de señalización reguladoras de FGF23 mediadas por FGFR. Las mutaciones activadoras del FGFR1 se asocian a hipofosfatemia e incremento de FGF23. Este efecto podría ser mediado a través la vía canónica, no canónica o la intracrina. <sup>270</sup>

### **6.5 FGF23 en la Enfermedad Renal Crónica**

La ERC se considera la principal causa secundaria de elevación de FGF23 <sup>80,167</sup>. Diferentes estudios han demostrado que FGF23 se incrementa de forma progresiva a

medida que desciende el filtrado glomerular alcanzando sus niveles máximos en pacientes en HD <sup>271</sup>. El FG *per se* parece favorecer el incremento de FGF23 probablemente por la disminución de su aclaramiento renal. De hecho, durante un episodio de FRA, FGF23 se incrementa independientemente del nivel de fosfato, vitamina D y PTH <sup>272</sup>. Recientemente, otro estudio en ratas nefrectomizadas demostró que FGF23 se incrementa rápidamente tras la realización de la nefrectomía, y esta elevación es independiente de los niveles de PTH, calcio o fosfato <sup>273</sup>. Este estudio también demostró que, en estados de ERC, el FGF23 circulante predominante es la molécula intacta, sugiriendo una disminución en la proteólisis favorecida por la uremia o bien una mayor liberación de depósitos intracelulares de FGF23 <sup>272</sup>. Otro dato importante, es la capacidad renal de metabolizar FGF23. La medición de FGF23 en arteria y vena renal demostró que FGF23 es aclarado por el riñón. Consecuentemente, un porcentaje de la acumulación de FGF23 en pacientes con ERC es debido a la disminución del FG que conlleva a una acumulación de la molécula <sup>273</sup>.

Los niveles más elevados de FGF23 se han observado en pacientes en diálisis. En estos, FGF23 se ha asociado al incremento de fosfato y calcio, pero no de PTH <sup>44,235,271</sup>. Múltiples estudios han demostrado una asociación entre los niveles elevados de FGF23 y una mayor mortalidad independientemente de la presencia de factores de riesgo tradicionales en esta población <sup>49</sup>. Tras el trasplante renal, FGF23 desciende rápidamente hasta el 50% del valor inmediatamente anterior al trasplante. Este descenso se acompaña de un incremento progresivo en los niveles de *Klotho* <sup>274,275</sup>. Sin embargo, a pesar de este descenso, FGF23 continúa asociándose a una mayor mortalidad tras el trasplante, quizás por la existencia de factores de riesgo residual atribuido a otras variables causantes de una mayor mortalidad en esta población. <sup>276</sup>

## **6.6 Impacto Clínico y Aproximación Terapéutica Para El Control Del HPTS y FGF23**

Múltiples estudios observacionales han demostrado la existencia de un mayor riesgo de muerte asociado con el incremento de fosfato sérico <sup>61,99,277</sup>. Dada su estrecha relación



con FGF23, este último actualmente se considera un biomarcador que define fiablemente el riesgo de resultados adversos en pacientes con ERC <sup>80</sup>.

En la última década varios estudios han demostrado la asociación entre FGF23 y una mayor tasa de mortalidad y morbilidad tanto en la población general como en pacientes con ERC en diálisis y en receptores de trasplante renal <sup>278</sup>. A pesar de lo heterogéneo de las poblaciones estudiadas, los resultados son consistentes en términos de la asociación entre FGF23 y un mayor riesgo de IAM, ictus, ICC, infecciones y mortalidad por todas las causas <sup>278</sup>.

Las mayores evidencias se han obtenido de pacientes en HD <sup>44,49,279</sup>. Estos resultados se mantienen independientemente de los factores de confusión incluidos en los modelos. Sin embargo, es posible que el género y la ECV previa puedan modificar esta asociación en pacientes incidentes <sup>279</sup>. Estos resultados han sido corroborados en pacientes con ERC no diálisis <sup>6</sup> y en la población general <sup>280</sup>. Es de esperar, que dado el efecto demostrado de FGF23 sobre el desarrollo de HVI <sup>54</sup>, enfermedad coronaria, <sup>149</sup> y la disfunción de macrófagos y neutrófilos <sup>56</sup>, este se asocie a una mayor mortalidad por causas aparentemente no relacionadas con la producción de FGF23. recientemente, estudios longitudinales han demostrado que pacientes con ERC en quienes los niveles de FGF23 muestran una tendencia creciente en el tiempo, son los que muestran un peor pronóstico <sup>281</sup>. Los efectos extra-renales de FGF23, han demostrado que FGF23 es toxico para algunos tejidos corporales como el corazón, el hueso, el endotelio e hígado incrementando también la morbilidad de los pacientes con ERC <sup>194,282</sup>. Sin embargo, la existencia simultanea de otros factores de riesgo residuales podrían sugerir casualidad y no causalidad. De hecho, en esta línea, un estudio sugiere que este efecto podría depender de otras variables como los niveles de *Klotho*, de tal forma que el efecto toxico de FGF23 desaparece cuando los niveles de *Klotho* son normales <sup>283</sup>. Además, este efecto de FGF23 sobre la mortalidad cardiovascular podría depender de la presencia de ERC <sup>192</sup> y no ser la causa directa de la ECV <sup>284</sup>. A pesar de la evidencia actual, futuros estudios deberán definir con mayor claridad esta asociación. La medición longitudinal de FGF23 en conjunto con otras variables como *Klotho* y el ajuste por variables con poder demostrado

de causar una mayor mortalidad, podrán permitirnos conocer de forma más precisa los mecanismos subyacentes de esta asociación. Más relevante sería el demostrar que la reducción de FGF23 mediante las distintas maniobras terapéuticas se traduce en descenso de la mortalidad asociada.

Dada la contribución de cada uno de los factores relacionados con el desarrollo del HPTS y su impacto clínico, es de esperar que las maniobras terapéuticas para el control del HPTS vayan encaminadas a normalizar los desajustes en el fosfato, calcio, PTH y potencialmente FGF23. En esta línea, debemos considerar que, en ocasiones, los tratamientos utilizados para el control de algunas de las anormalidades bioquímicas características de HPTS pueden desencadenar desajustes en el control de otras. A continuación, se describirá de forma resumida el estado actual del tratamiento del HPTS.

#### 6.6.1 Restricción de fosfato: Dieta

El control del fosfato es crítico para prevenir y tratar el HPTS <sup>51,64</sup>. Las recomendaciones actuales sugieren que los niveles de fosfato deben tender a la normalidad. <sup>16,64</sup> Dentro de las recomendaciones dietarías, no solo se debe incluir la reducción en su ingesta sino también la valoración de las fuentes. Evidencia reciente sugiere que, debido a sus características, las sales de fosfato proveniente de los aditivos, fosfato inorgánico, presenta un mayor índice de absorción a nivel intestinal comparado con el fosfato de origen animal y vegetal <sup>285</sup>. La valoración del contenido de proteína en la dieta, una de las principales fuentes de fosfato, es prioritaria debido a que la alta ingesta de proteínas se asocia a hiperfosfatemia en la población en diálisis. Esta restricción se debe racionalizar considerando el estado clínico del paciente debido al riesgo de desnutrición con dietas muy restrictivas <sup>286</sup>. De hecho, existe evidencia de que la racionalización en el consumo de proteínas se asocia no solo a un mejor control del metabolismo óseo mineral, sino también a otros beneficios. <sup>287</sup> Además, las dietas bajas en proteínas también se han asociado al descenso de FGF23. <sup>288</sup>

### 6.6.2 Captores de Fosfato

Su mecanismo de acción consiste en inhibir la absorción de fosfato a nivel intestinal. A día de hoy, existe múltiples captadores de fosfato y aunque poseen características importantes, que en algunos casos van más allá de impedir la absorción de fosfato, el captador ideal continúa siendo una tarea pendiente en la práctica clínica diaria. Lo anterior, está sustentado en que el captador ideal debería ser altamente eficaz independientemente del Ph intestinal sin incrementar el número de comprimidos a consumir diariamente por parte de los pacientes, no ser absorbido, inducir escasos efectos adversos y tener un bajo coste económico <sup>289</sup>.

De manera general, existen dos tipos de captadores, aquellos con contenido cálcico y sin contenido cálcico.

#### 6.6.2.1 Captadores con contenido cálcico

Este tipo de captadores contienen principalmente calcio en dos formas, carbonato y acetato. De acuerdo con las recomendaciones KDIGO, actualmente se recomienda la utilización restringida de este tipo de captadores dado su mayor riesgo de hipercalcemia, desarrollo de calcificaciones coronarias y de incremento de FGF23 <sup>62-64,290</sup>. Independientemente de esto, este tipo de captadores han demostrado ser eficaces en la reducción del fosfato sérico.

Recientemente se ha comercializado un componente con contenido cálcico y magnesio. Este compuesto, ha demostrado tener la misma efectividad que sevelamero en el control del fosfato sérico sin apenas incrementar los niveles de calcio sérico. Mas interesantemente, debido al efecto del magnesio sobre la PTH y sobre la CV, podría ser de gran utilidad en pacientes con ERC avanzada y en HD <sup>291,292</sup>.

#### 6.6.2.2 Captadores sin contenido cálcico

El Sevelamero no solo ha demostrado controlar los niveles de fosfato sérico sino también reducir el tamaño de la glándula paratiroides y reducir la proliferación celular

asociada a la hiperfosfatemia <sup>293</sup>. También se asocia a la reducción de FGF23 en pacientes con ERC <sup>294</sup>. Adicionalmente, se le atribuyen funciones pleiotrópicas por su capacidad para la reducción del colesterol total y LDL <sup>295</sup>.

Carbonato de lantano es otro captor de fosfato sin contenido cálcico que se caracteriza por una casi nula absorción intestinal. Aunque ha demostrado reducir no solo los niveles de fosfato sino también los de calcio y PTH, esto no se ha visto reflejado de forma positiva en una reducción de la mortalidad <sup>296</sup>. Posee además la capacidad de incrementar la sensibilidad de los CaSR paratiroides al calcio, lo que le confiere una ventaja sustancial sobre otros captores <sup>297</sup>. Sin embargo, los síntomas gastrointestinales asociados a su utilización reducen su adherencia.

Finalmente, los captores con contenido férrico han demostrado su eficacia en la reducción de fosfato tanto en población en diálisis como en no diálisis <sup>254,298</sup>. Además, algunas de sus presentaciones comerciales también favorecen el control de alteraciones en el metabolismo del hierro y de la anemia asociada a la ERC <sup>299</sup>. Recientemente, se ha demostrado que el oxihidróxido sucroférico se asocia a la reducción de los niveles circulantes de FGF23 <sup>300</sup>.

Si bien, todos los captores de fosfato sin contenido cálcico han demostrado reducir no solo los niveles de fosfato, sino también los niveles de FGF23 en pacientes con ERC, estos mismos resultados de momento no han podido ser reproducidos de forma consistente en pacientes en diálisis <sup>40,236</sup>.

### 6.6.3 Vitamina D y análogos

El calcitriol, mediante su acción sobre los VDR, disminuye la producción de PTH y la proliferación de células paratiroides <sup>76,301</sup>, por lo que su reducción en ERC contribuye de forma trascendental en el desarrollo de HPTS. Sin embargo, la principal complicación asociada a su uso es la hipercalcemia y la hiperfosfatemia que contraindican su utilización. En esta línea, la utilización del calcidiol, que requiere la conversión hasta formas activas de la vitamina D y que posee una vida media más

corta que el calcitriol, podría disminuir la incidencia de los efectos indeseados del calcitriol.

Los análogos de la vitamina D poseen características comunes con el calcitriol como son su vida media prolongada. Además, incrementan la sensibilidad de la glándula paratiroidea a la acción del calcio, mediante un incremento en la expresión de CaSR. Adicionalmente, han demostrado reducir la incidencia de hipercalcemia <sup>302</sup>. Por otro lado, su utilización en pacientes con ERC y proteinuria también se ha asociado a una reducción de la proteinuria <sup>303</sup>. Si bien, las nuevas presentaciones de la vitamina D, bien como análogos o bien como vitamina D nutricional se han asociado al descenso de los niveles de la PTH, tienen el inconveniente de incrementar la producción de FGF23 <sup>65,66</sup>.

#### 6.6.4 Calcio

Debido a la estrecha relación existente entre los niveles de calcio y la regulación de la PTH, es de esperar que las altas concentraciones de calcio independientemente de su fuente reduzcan los niveles de PTH. Sin embargo, los pacientes con ERC suelen cursar con niveles séricos de calcio en el límite inferior de la normalidad principalmente asociado a una disminución de su ingesta y a la reducida absorción intestinal secundaria al déficit de calcitriol <sup>304,305</sup>.

En relación al líquido de diálisis, existen diferentes concentraciones. El incremento de la concentración de calcio en el líquido de diálisis ha demostrado reducir los niveles de PTH. <sup>306</sup> Sin embargo, a pesar de múltiples estudios realizados con el objetivo de identificar la concentración de calcio ideal, continuamos sin tener una respuesta definitiva. Bien por incremento de arritmias, ICC o hipotensiones tras la exposición a concentraciones bajas de calcio en el líquido de diálisis, o por el contrario un incremento de la carga de calcio y el consecuente desarrollo de calcificaciones extraóseas <sup>152,307,308</sup>. En lo que si hay consenso es en la imperativa necesidad de evitar líquidos de diálisis con concentraciones muy altas de calcio <sup>64</sup>. Es probable que la individualización o el ajuste intradiálisis del concentrado de diálisis en función del

balance de calcio sea lo adecuado. Sin embargo, esto no solo incrementaría los costes, sino también la el riesgo de anemia.

#### 6.6.5 Calcimiméticos

El descubrimiento del CaSR revolucionó el tratamiento del HPTS. Dada su expresión sobre glándulas paratiroides y su gran potencia para suprimir la liberación de PTH, recreando la acción del calcio, los calcimiméticos han logrado disminuir sustancialmente las complicaciones asociadas a niveles elevados de PTH durante largos periodos de tiempo. Además, han logrado también reducir la incidencia de paratiroidectomías <sup>7,76</sup>.

En pacientes en HD, cinacalcet ha mostrado una reducción sustancial de la PTH, aunque inicialmente no demostró reducir la mortalidad <sup>85</sup>. Sin embargo, análisis *post hoc* describen una disminución de la mortalidad de origen cardiovascular en sujetos con reducciones superiores de PTH >30% <sup>44</sup>. También, se ha asociado a una reducción de FGF23 <sup>44</sup>. Varios estudios han demostrado su eficacia individual o en combinación con análogos de la vitamina D en un intento de potenciar los efectos beneficiosos de ambas preparaciones. En general, los sujetos que recibieron una combinación de cinacalcet con paricalcitol presentaron reducciones superiores de PTH en comparación con aquellos que solo recibieron un análogo de la vitamina D <sup>138,309</sup>.

Recientemente, la introducción de Etelcalcetida, un péptido sintético que a diferencia del cinacalcet, tiene una vida media más prolongada y que debido a su aplicación intravenosa mejora la adherencia al tratamiento ha demostrado una reducción de PTH comparable a cinacalcet <sup>310</sup>. También parece reducir los síntomas digestivos como las náuseas y los vómitos. Este compuesto, también ha demostrado reducir los niveles de FGF23 <sup>311</sup>. Este efecto de los calcimiméticos sobre los niveles circulantes de FGF23 podría ser explicado por su efecto sobre la PTH y por tanto sobre los niveles de fosfato y calcio al reducir la resorción ósea <sup>312</sup>.

#### 6.6.6 Paratiroidectomía

Clásicamente es un procedimiento reservado para pacientes con HPTS severo sin una respuesta adecuada al tratamiento médico <sup>18,64</sup>. Debido a la existencia de los calcimiméticos, y de los análogos de la vitamina D, el porcentaje de paratiroidectomías se ha reducido drásticamente en los últimos 20 años <sup>313</sup>. Los pacientes sometidos a paratiroidectomía muestran un descenso rápido y marcado tanto de PTH como de FGF23 lo que demuestra la estrecha relación entre la PTH y la producción de FGF23 <sup>47</sup>. Además, aquellos sujetos sometidos a paratiroidectomía por SPTH refractario han mostrado una reducción de la mortalidad y menos eventos coronarios y vasculares periféricos <sup>68,314</sup>.

# ***MÉTODOS Y RESULTADOS***





## **7. METODOLOGÍA GENERAL**

Dado el amplio número de análisis estadísticos realizados de acuerdo a cada uno de los objetivos planteados, en la sección de métodos se describen los criterios de inclusión y exclusión generales. En cada capítulo de los resultados se describirán los criterios de inclusión específicos de la población estudiada, las determinaciones analíticas analizadas y los análisis estadísticos específicos utilizados para la obtención de los resultados.

La realización de este estudio fue autorizada por el comité de ética institucional para la investigación de Córdoba (Comité de Ética de la Investigación de Córdoba; ref.2769, protocolo FGF23\_HD\_2015). Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado por escrito para ser incluidos el estudio.

### **7.1.1 Criterios de inclusión y exclusión generales**

7.1.1.1 Criterios de inclusión: Mayores de 18 años, prevalentes en hemodiálisis y clínicamente estables sin evidencia enfermedad inflamatoria, proceso infeccioso o neoplasia.

7.1.1.2 Criterios de exclusión: Se excluyeron pacientes sometidos previamente a paratiroidectomía, con diuresis residual superior a 500 mililitros en 24 horas, un estado nutricional deficiente, incapacidad para proporcionar un consentimiento informado por escrito (deterioro cognitivo) o falta de voluntad para participar en el estudio.

### **7.1.2 Muestras de sangre, medidas y ensayos de determinación**

Se obtuvieron muestras de plasma antes de la sesión de hemodiálisis de mitad de la semana. El fosfato sérico y el calcio iónico en suero se midieron en las siguientes 6 horas tras de la extracción. Alícuotas para la medición de iPTH, 25 (OH) D, 1,25 (OH)<sub>2</sub> D,

iFGF23 y cFGF23 se almacenaron a -80 °C, de modo que todas las muestras se midiesen el mismo día.

El calcio iónico en sangre se midió con un electrodo específico (analizador de gases en sangre de la serie Ciba-Corning 800, Ciba-Corning, Essex, Reino Unido; rango de referencia, 1.13-1.32 mmol/l). El fosfato sérico se midió por espectrofotometría (Biosystems, Barcelona, España; rango de referencia, 2.4 a 4.5 mg/ l). Los niveles de 25 (OH) D y 1,25 (OH) 2D se midieron mediante RIA (Immunodiagnostic Systems, Boldon, Reino Unido; rango de referencia 8-42 ng/ml y 18-71 pg/ml, respectivamente). La PTH en suero se determinó por IRMA (perla recubierta, Scantibodies Laboratory, Santee, CA; rango de referencia, 15-65 pg/ml). La molécula cFGF23 se midió en plasma mediante un ELISA tipo sandwich (Immutopics Inc., San Clemente, CA. Los CV intra e interensayos fueron 2.4% y 4.7%). iFGF23 fue medido por ELISA que reconoce la proteína activa intacta (Laboratorios Kainos, Tokio, Japón. Los CV entre ensayos y intraensayos fueron de 2,8% y 3,8% respectivamente; rango de referencia, 8,2-54,3 pg/ml). La proteína C reactiva se midió mediante el ensayo de alta sensibilidad (rango de referencia, 0,3-5 mg/l). Se utilizó inmunturbidimetría (bromocresol púrpura) para medir la albúmina sérica (rango de referencia, 3,4-5 g/dl). La fosfatasa alcalina sérica se determinó mediante el ensayo de 4-nitro-fenilfosfato (rango de referencia, 35- 104 U/l).

Se analizaron variables antropométricas, clínicas, el tipo de acceso vascular, el KT, el KtV, el tiempo de duración de la sesión de diálisis y el tiempo total de permanencia en diálisis.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS 25.0 (Chicago, Illinois) y el GraphPad Prism 6.0c (GraphPad Software, La Jolla, CA). Los valores de  $P < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

# ***RESULTADOS***



## **8. RESULTADOS**

Como consecuencia de que esta tesis doctoral plantea la realización de cuatro objetivos diferentes, los resultados se mostraran en cuatro capítulos de acuerdo a cada. Cada capítulo describirá la población utilizada, las determinaciones analíticas analizadas, los diferentes test estadísticos utilizados y los resultados obtenidos. Adicionalmente cada capítulo finalizará con una sección de conclusiones específicas que serán complementadas posteriormente con una sección de conclusiones generales.

## **8.1 CAPÍTULO 1**

## **8.2 FACTORES RELACIONADOS CON EL INCREMENTO DE FGF23**

### **8.2.1 Métodos**

#### **8.2.1.1 Tipo de estudio**

Estudio Transversal

#### **8.2.1.2 Población**

Para la consecución de este objetivo se incluyeron 150 pacientes prevalentes en hemodiálisis. Los criterios de inclusión y exclusión se resumen a continuación.

8.2.1.2.1 Criterios de inclusión: Los descritos en la sección 7.1.1.1

8.2.1.2.2 Criterios de exclusión: Los descritos en el apartado 7.1.1.2

#### **8.2.1.3 Determinaciones sanguíneas y demográficas**

A todos los sujetos incluidos se les determinaron niveles sanguíneos de calcio iónico, calcio sérico total, fosfato, iPTH, calcidiol y calcitriol, albumina, *hs*-CRP, ferritina, TSAT y Hb. Se determinaron ambas isoformas de FGF23, iFGF23 y cFGF23.

En relación a variables demográficas se analizaron variables antropométricas y clínicas, la técnica de diálisis (HF-HD o OL-DHF), el tipo de acceso vascular, el KT, el KtV, el tiempo de duración de la sesión de diálisis y el tiempo total de permanencia en diálisis. Finalmente, también se consideró en el análisis los tratamientos relacionados con el control de las alteraciones del metabolismo óseo mineral como los captores con y sin

contenido cálcico, paricalcitol y cinacalcet.

#### **8.2.1.4 Análisis estadístico**

Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (SD) o mediana (rango intercuartílico, IQR) según correspondiese. Los datos categóricos se expresan como frecuencias y proporciones. Tras aplicar las pruebas de normalidad, las variables que no tenían una distribución normal, como FGF23, iPTH y *hs*-CRP fueron transformadas a su forma logarítmica natural. La prueba de correlación de Spearman se utilizó para evaluar las correlaciones entre dos variables numéricas. Las diferencias grupales para comparaciones no paramétricas numéricas se determinaron mediante los test estadísticos de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. Por el contrario, las comparaciones paramétricas numéricas se realizaron utilizando el test estadístico de ANOVA de una vía (One-Way ANOVA) con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Inicialmente, la población de estudio fue analizada en su conjunto, para describir las características de la población general y realizar estudios de correlación. Después fue dividida en dos grupos de acuerdo a la mediana de fosfato (un grupo con niveles de fosfato  $<4.35$  mg/dl y otro con niveles de fosfato  $>4.35$  mg/dl) y se realizaron comparaciones con todas las variables estudiadas. Finalmente, la población general se dividió de acuerdo a los terciles de fosfato y se realizaron nuevamente comparaciones con el resto de variables estudiadas.

El siguiente paso, incluyó la realización de modelos de regresión lineal (procedimiento de selección por pasos hacia adelante) para examinar los factores que determinan los niveles séricos de iFGF23 y cFGF23 en la población general ( $n = 150$ ). Las variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariable y otras consideradas clínicamente relevantes se incluyeron en el análisis multivariante. A continuación, se realizó un análisis de regresión multivariante adicional en pacientes con niveles de fosfato sérico por debajo o por encima de la mediana, para valorar si las diferentes concentraciones de este parámetro se asociaban a cambios en los factores determinantes de FGF23. Biológicamente, existe una estrecha colinealidad entre los niveles de calcio,



fosfato, PTH y FGF23. Consecuentemente, la colinealidad entre estos factores se corrigió restringiendo el índice de condición hasta un máximo de 20, siguiendo los criterios de Belsley <sup>315</sup>. Además, la contribución proporcional de cada predictor sobre el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se cuantificó mediante el cálculo de los pesos relativos de Johnson ( $RW$ ) <sup>316,317</sup>. Los  $RW$  se calcularon para todas las variables incluidas en el análisis de regresión lineal, aunque algunas de ellas no fueron estadísticamente significativas. La prueba de significación de los  $RWs$  se calculó mediante el método de Tonidandel <sup>318</sup> exclusivamente para las variables estadísticamente significativas en los modelos de regresión lineal, en un intento de facilitar su interpretación. La significación de los  $RWs$  se informa como intervalos de confianza (IC); si se excluye el cero en el IC, los pesos son significativamente diferentes. Este enfoque estadístico permite cuantificar la contribución proporcional de cada variable en la ecuación de regresión en combinación con otras variables ( $RW$ ). Tras constatar la notable asociación entre los niveles de fosfato sérico y FGF23, finalmente estratificamos a los pacientes en diferentes grupos según la mediana de niveles séricos de fosfato, iFGF23 y cFGF23 y se contrastaron con el resto de variables de interés. Se obtuvieron cuatro grupos diferentes combinando: fosfato sérico alto o bajo con iFGF23 alto o bajo. Otros cuatro grupos se obtuvieron combinando fosfato sérico alto o bajo con niveles séricos altos y bajos de cFGF23. Según los valores de iFGF23, los grupos fueron Bajo Fosfato / bajo iFGF23, bajo Fosfato / alto iFGF23, alto Fosfato / bajo iFGF23 y alto Fosfato / alto iFGF23. En relación con el cFGF23, los grupos fueron: bajo Fosfato / bajo cFGF23, bajo Fosfato / alto cFGF23, alto Fosfato / bajo cFGF23 y alto Fosfato / alto cFGF23.

## **8.2.2 Resultados**

### **8.2.2.1 Descripción general de la población estudiada**

La tabla 1 resume las características generales, clínicas y bioquímicas de la población. La mediana de edad de los sujetos era de 71 años y más de la mitad de los pacientes incluidos eran hombres. El 83% de los sujetos eran hipertensos. En general, los niveles de fosfato, calcio, iPTH, Hb, TSAT y ferritina se encontraban dentro del rango esperado (Tabla1). El 44.7% de los sujetos tenían prescritos dentro de su medicación habitual captadores de

fosfato, 27.3% paricalcitol y únicamente el 13.3% cinacalcet para tratamiento del HPTS.

Variable	n=150
Edad (años) §	71.0 (58.7–81.0)
IMC §	26.1 (22.1 – 30.2)
<b>Genero (n, %)</b>	
Masculino	85 (56.7)
Femenino	65 (43.3)
<b>Etiología ERC</b>	
Desconocida (%)	36.0
Diabetes (%)	18.0
Hipertensión (%)	5.3
Glomerulonefritis (%)	10.7
Poliquistosis (%)	14.0
Otras (%)	16.0
<b>Comorbilidades</b>	
Hipertensión (%)	83.3
Diabetes (%)	29.3
Enfermedad Coronaria (%)	21.3
Enfermedad cerebrovascular (%)	12.7
<b>Índice de Comorbilidad de Charlson §</b>	4.0 (2.0–5.0)
<b>Tipo de Acceso vascular</b>	
AV Fistula, n (%)	102 (68.0)
Catéter, n (%)	41 (27.3)
Injerto Gore-Tex, n (%)	7 (4.7)
<b>Calcio del Líquido de diálisis 3 mEq/l (n, %)</b>	131 (87.3)
<b>Técnica de Diálisis</b>	
HF-HD (n, %)	69 (46)
OL-HDF (n, %)	81 (54)
<b>Tiempo en Diálisis (meses) §</b>	50.1 (17.5–82.1)
<b>Duración sesión de Diálisis (mins) §</b>	250.0 (240.0–250.0)
<b>KtV §</b>	1.9 (1.7–2.3)
<b>Kt (L/sesión) §</b>	59.8 (52.0–64.0)
<b>Albumina (g/L)</b>	3.7 (3.4–3.9)
<b>Hb (g/L) c, §</b>	11.2 (10.4–12.0)
<b>TSAT (%) d, §</b>	26.0 (21.0–34.0)
<b>Ferritina (ng/dl) §</b>	468.5 (327.0–742.2)
<b>hs-CRP (mg/L) e, §</b>	7.2 (3.5–10.8)
<b>Ca (mg/dL) e, §</b>	8.8 (8.4–9.2)
<b>iCa (mEq/L) f, §</b>	2.2 (2.1–2.3)
<b>Fosfato (mg/dl) g, §</b>	4.3 (3.7–5.3)
<b>Fosfatasa Alcalina (U/L) §</b>	90.5 (71.0–121.0)
<b>iPTH (pg/ml) h, §</b>	263.0 (151.7–434.5)
<b>25(OH)D (ng/ml) i, §, *</b>	8.1 (6.9–10.5)
<b>1,25 (OH)<sub>2</sub> D (pg/ml) j, §, *</b>	11.0 (5.0–14.8)
<b>iFGF23 (pg/ml) k, §</b>	502.5 (167.0–1224.5)
<b>cFGF23 (RU/ml) l, §</b>	900.5 (400.2–1819.7)
<b>Captadores de Fosfato (n, %)</b>	67 (44.7)
<b>Paricalcitol (n, %)</b>	41 (27.3)
<b>Cinacalcet (n, %)</b>	20 (13.3)

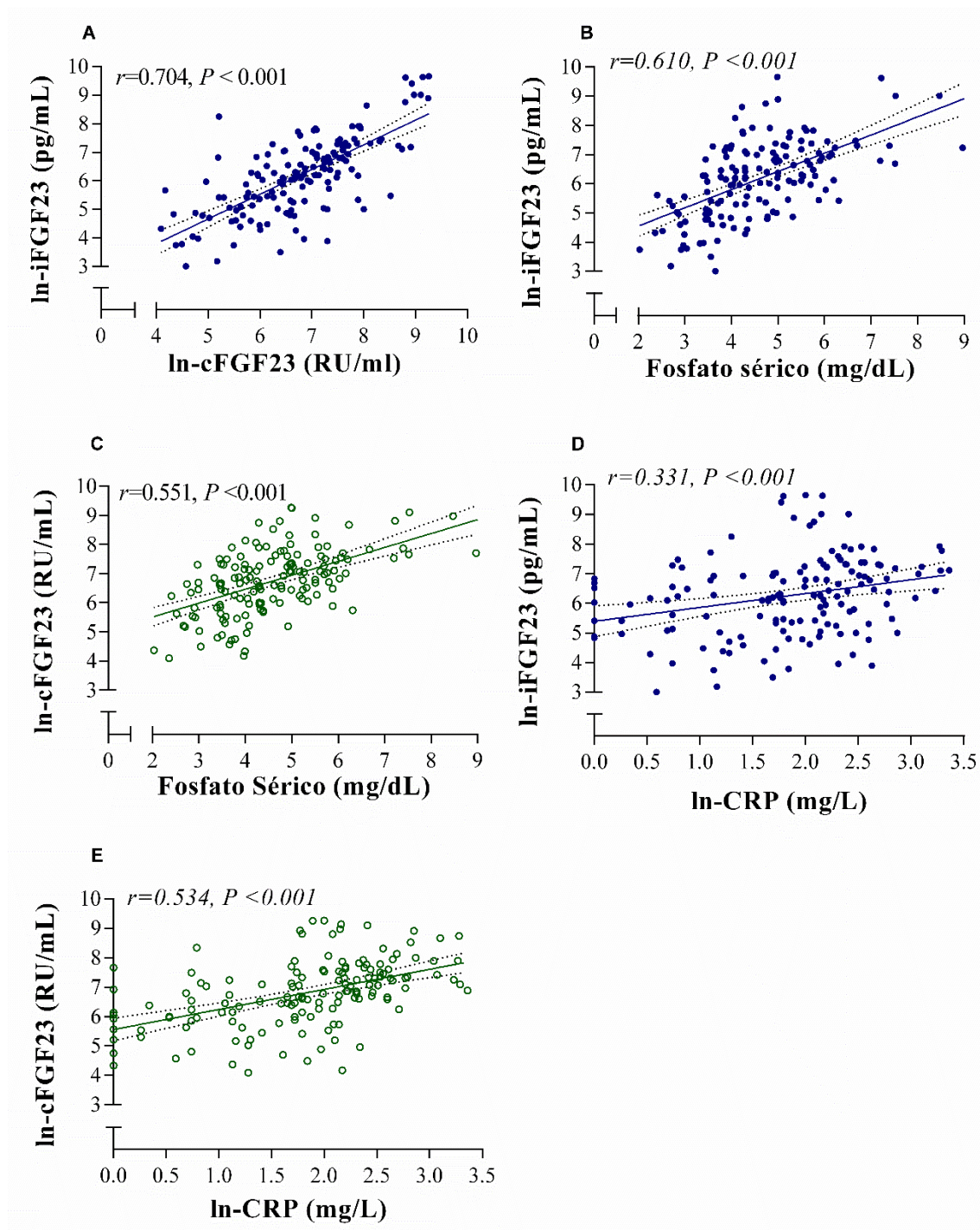
Table 1. Características demográficas, clínicas y bioquímicas de la población incluida en el estudio e(n=150). § Mediana.

### 8.2.2.2 Correlación de FGF23 con otras variables.

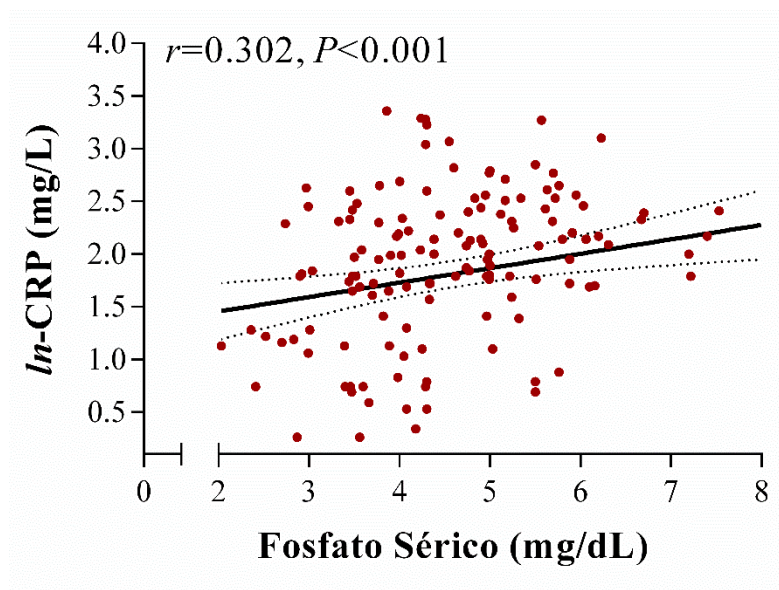
Ambas moléculas de FGF23 se correlacionaron significativamente con la concentración sérica de fosfato, *hs*-CRP, la edad y la iPTH (Tabla 2 y figura 5). Además, ln-cFGF23 mostró una correlación positiva con el tiempo de permanencia en diálisis y una correlación negativa con los niveles de 25 (OH) D (Tabla 2). Además, se observó una correlación significativa entre la concentración sérica de fosfato sérico y los niveles de *hs*-CRP (Figura 6). No observamos correlación entre el uso de hierro ni la dosis, así como tampoco entre el uso y la dosis de eritropoyetina con los niveles séricos de FGF23.

Variable	ln-iFGF23		ln-cFGF23	
	<i>r</i>	<i>P</i> *	<i>r</i>	<i>P</i> *
<b>ln-cFGF23</b>	0.70	<0.001	-----	-----
<b>Edad</b> (años)	-0.25	<0.01	-0.26	<0.01
<b>Tiempo en Diálisis</b> (meses)	-0.02	0.74	0.21	<0.01
<b>Hb</b> (g/l)	0.05	0.49	-0.01	0.86
<b>TSAT</b> (%)	-0.05	0.49	-0.04	0.58
<b>Ferritina</b> (ng/l)	-0.04	0.58	0.02	0.79
<b>ln-CRP</b> (mg/l)	0.33	<0.001	0.53	<0.001
<b>iCa</b> (mEq/l)	0.03	0.70	-0.14	0.07
<b>Fosfato</b> (mg/dl)	0.61	<0.001	0.55	<0.001
<b>ln-iPTH</b> (pg/ml)	0.29	<0.001	0.29	<0.001
<b>25(OH)D</b> (ng/ml)	-0.06	0.44	-0.15	0.05
<b>1,25 (OH)<sub>2</sub> D</b> (pg/ml)	0.03	0.67	0.06	0.46

**Tabla 2. Correlaciones lineales simples entre ambas moléculas de FGF23 y otros parámetros demográficos, clínicos y bioquímicos analizados (n = 150).**



**Figura 5. Correlaciones entre FGF23, parámetros de ERC-EOM y ln-CRP.** Los niveles séricos de FGF23 y CRP fueron transformados de acuerdo al logaritmo natural. La línea de regresión se representa como una línea continua y la línea discontinua representa el intervalo de confianza (IC del 95%). Los círculos cerrados representan ln-iFGF23 y los círculos abiertos representan ln-cFGF23. Gráfico de dispersión de iFGF23 vs cFGF23 (A), iFGF23 y cFGF23 vs fوسفات sérico (B-C) e iFGF23 y cFGF23 vs niveles de *hs*-CRP (D-E).



**Figura 6. Diagrama de dispersión de los niveles de fosfato sérico y de la PCR en los 150 pacientes en hemodiálisis regular.**

#### 8.2.2.3 Terciles de fosfato contrastados en función de las otras variables analizadas

En comparación con el tercil más bajo, los pacientes con los niveles de fosfato más elevados eran más jóvenes ( $P= 0.09$ ), aunque no era estadísticamente significativo. Además, también mostraban niveles superiores de *hs*-CRP ( $P= 0.01$ ), iPTH ( $P<0.001$ ), iFGF23 ( $P<0.01$ ) y cFGF23 ( $P<0.001$ ). Los niveles de calcio total y de calcio iónico en suero eran superiores en aquellos sujetos con los niveles más bajos de fosfato.

El BMI, el porcentaje de sujetos de género masculino y las diferentes co-morbilidades eran comparables entre cada uno de los grupos. Tampoco se observaron diferencias en el número de co-morbilidades por grupo.

En relación al tipo de acceso vascular de los sujetos analizados, el número de fistulas nativas, de catéteres permanentes o de injertos de goretex era similar entre los grupos.

La modalidad de hemodiálisis utilizada, OL-HDF o HF-HD, se distribuyó de forma uniforme entre cada uno de los grupos y no se observaron diferencias estadísticamente significativas. De igual forma, el tiempo de permanencia en diálisis, los niveles de albumina, TSAT, ferritina, calcidiol y calcitriol eran comparables entre los grupos (tabla 3).

Variable	T1 (n=49) <3.98 mg/dl	T2 (n=52) 3.99-4.99 mg/dl	T3 (n=49) >5 mg/dl	P
<b>Edad</b> (años) <sup>¶</sup>	72.3 ± 15.7	66.2 ± 14.3	67.3 ± 14.5	0.09
<b>BMI</b> (kg/cm) <sup>a</sup>	26.4 ± 6.47	26.1 ± 6.23	27.0 ± 4.82	0.73
<b>Genero</b> (masculino; n, %)	26 (53.1)	31 (59.6)	28 (57.1)	0.79
<b>Co-morbilidades</b>				
<i>Hipertensión</i> (%)	43 (87.8)	42 (80.8)	40 (81.6)	0.59
<i>Diabetes</i> (%)	15 (30.6)	15 (28.8)	14 (28.6)	0.97
<i>Enfermedad coronaria</i> (%)	13 (26.5)	10 (19.2)	9 (18.4)	0.55
<i>Enfermedad cerebrovascular</i> (%)	4 (8.2)	8 (15.4)	7 (14.3)	0.50
<b>Índice charlson</b>	4.0(2.0—5.0)	4.0 (2.0—5.0)	4.0 (2.0—5.0)	0.93
<b>Acceso vascular</b>				
<i>Fistula nativa, n (%)</i>	38 (77.6)	30 (57.7)	33 (67.3)	0.10
<i>Catéter, n (%)</i>	10 (20.4)	17 (32.7)	14 (28.6)	0.37
<i>Goretex, n (%)</i>	1 (2.0)	5 (9.6)	2 (4.1)	0.21
<b>Calcio en Líquido 3 mEq/l</b> (n, %)	44 (89.8)	44 (84.6)	43 (87.8)	0.73
<b>Técnica diálisis</b>				
<i>HF-HD</i> (n, %)	28(44.9)	21 (40.4)	26 (53.1)	
<i>OL-HDF</i> (n, %)	27 (55.1)	31 (59.6)	23 (46.9)	0.43
<b>Tiempo en diálisis</b> (meses) <sup>b, §</sup>	54.8 (16.9—84.5)	49.2 (16.4—76.8)	47.3 (18.6—86.5)	0.96
<b>Albumina</b> (g/l) <sup>¶</sup>	3.64 ± 0.36	3.71 ± 0.32	3.70 ± 0.42	0.58
<b>Hb</b> (g/l) <sup>c, ¶</sup>	11.3 ± 1.22	11.1 ± 1.21	11.1 ± 1.41	0.58
<b>TSAT</b> (%) <sup>d, ¶</sup>	28.7 ± 15.0	26.9 ± 9.90	28.8 ± 12.3	0.68
<b>Ferritina</b> (ng/l) <sup>§</sup>	436.0 (343.0—714.5)	504.0 (331.5—742.7)	472.0 (287.5—849.5)	0.59
<b>hs-CRP</b> (mg/L) <sup>e, §</sup>	5.2 (2.6—8.2)	7.3 (4.2—10.9)	8.8 (5.8—12.4)	0.01
<b>Ca</b> (mg/dL) <sup>e, ¶</sup>	8.86 ± 0.47	8.81 ± 0.64	8.55 ± 0.77	0.03
<b>iCa</b> (mEq/L) <sup>g, ¶</sup>	2.21 ± 0.11	2.20 ± 0.16	2.13 ± 0.19	0.03
<b>Fosfato</b> (mg/dl) <sup>h, §</sup>	3.4 (2.9—3.7)	4.3 (4.1—4.8)	5.7 (5.3—6.2)	<0.001
<b>FA</b> (U/L) <sup>§</sup>	91.0 (74.5—115.0)	90.0 (69.0—121.7)	90.0 (71.0—124.0)	0.76
<b>iPTH</b> (pg/ml) <sup>i, §</sup>	162.0 (104.0—268.9)	327.5 (167.0—429.7)	392.0 (204.5—672.5)	<0.001
<b>25(OH)D</b> (ng/ml) <sup>j, ¶</sup>	10.7 ± 6.48	9.9 ± 5.02	9.0 ± 3.75	0.29
<b>1,25 (OH)<sub>2</sub> D</b> (pg/ml) <sup>k, ¶</sup>	9.7 ± 6.29	10.5 ± 6.73	12.6 ± 6.74	0.08
<b>iFGF23</b> (pg/ml) <sup>l, §</sup>	158.0 (77.5—438.0)	502.5 (218.5—1167.7)	1030.0 (539.5—1754.0)	<0.01
<b>cFGF23</b> (RU/ml) <sup>m, §</sup>	471.0 (191.5—874.0)	959.5 (419.0—2049.7)	1561.0 (879.0—2652.5)	<0.001

**Tabla 3. Características de la población incluida de acuerdo a terciles de fosfato y contrastadas con el resto de variables analizadas.** <sup>¶</sup> Media ± Desviación estándar (SD) <sup>§</sup> Mediana y rango intercuartílico (IQR).

#### 8.2.2.4 Factores asociados al incremento de iFGF23 y cFGF23. Análisis de regresión lineal

En los modelos de regresión lineal, tras realizar ajustes por factores de confusión, el fosfato sérico, la *hs*-CRP, y también la edad, se asociaron de forma independiente con los

niveles de iFGF23 y ln-cFGF23 (Tablas 4 y 5). Es de destacar que el calcio iónico en suero, pero no la iPTH, también se asoció de forma independiente con la alta concentración de iFGF23. El tiempo en diálisis solo se asoció de forma independiente a mayores niveles circulantes de cFGF23, pero no de iFGF23 (Tabla 4 y 5).

Análisis Multivariante		iFGF23	
Variable	Beta <sup>†</sup>	95% CI	P
<b>Modelo 1</b>			
hs-CRP (g/l)	0.16	0.06—0.48	0.01
iCa (mEq/l)	0.23	0.91—2.97	<0.001
Fosfato (mg/dl)	0.65	0.51—0.76	<0.001
<b>Modelo 2</b>			
Edad (años)	-0.15	-0.02— -0.03	0.01
hs-CRP (g/l)	0.18	0.10—0.51	<0.01
iCa (mEq/l)	0.22	0.84—2.86	<0.001
Fosfato (mg/dl)	0.61	0.48—0.72	<0.001
<b>Modelo 3</b>			
hs-CRP (g/l)	0.16	0.06—0.48	<0.01
iCa (mEq/l)	0.23	0.91—2.97	<0.001
Fosfato (mg/dl)	0.65	0.51—0.76	<0.001

**Tabla 4. Análisis de regresión lineal multivariable. Factores asociados al incremento de iFGF23 (n = 150).** <sup>†</sup> Coeficiente *Beta* estandarizado

**Modelo 1:** ajustado por fosfato sérico, calcio sérico iónico y hs-CRP. (R<sup>2</sup> = 0.47)

**Modelo 2:** ajustado para el modelo 1 más la edad, el tiempo en diálisis, ferritina sérica, iPTH, 25 (OH) D y 1,25 (OH) 2D. (R<sup>2</sup> = 0.50)

**Modelo 3:** ajustado para el modelo 1 más la concentración de calcio en el líquido de diálisis, el uso de captores con base de calcio, captores de fosfato sin calcio, paricalcitol, cinacalcet y eritropoyetina (R<sup>2</sup> = 0,47)

Análisis Multivariante		cFGF23	
Variable	Beta <sup>†</sup>	95% IC	P
<b>Modelo 1</b>			
hs-CRP (g/l)	0.35	0.34—0.69	<0.001
Fosfato (mg/dl)	0.50	0.32—0.52	<0.001
<b>Modelo 2</b>			
Edad (años)	-0.20	-0.02— -0.07	<0.001
Tiempo en Diálisis (meses)	0.23	0.003—0.01	<0.001
hs-CRP (g/l)	0.37	0.37—0.70	<0.001
Fosfato (mg/dl)	0.44	0.27—0.46	<0.001
<b>Modelo 3</b>			
hs-CRP (g/l)	0.35	0.34—0.69	<0.001
Fosfato (mg/dl)	0.50	0.32—0.52	<0.001

**Tabla 5. Análisis de regresión lineal multivariable. Factores asociados al incremento de cFGF23 (n = 150).** <sup>†</sup> Coeficiente *Beta* estandarizado

**Modelo 1:** ajustado por fosfato sérico, calcio sérico iónico y hs-CRP. ( $R^2 = 0.46$ )

**Modelo 2:** ajustado para el modelo 1 más la edad, el tiempo en diálisis, ferritina sérica, iPTH, 25 (OH) D y 1,25 (OH) 2D. ( $R^2 = 0.54$ )

**Modelo 3:** ajustado para el modelo 1 más la concentración de calcio en el líquido de diálisis, el uso de captores con base de calcio, captores de fosfato sin calcio, paricalcitol, cinacalcet y eritropoyetina ( $R^2 = 0.46$ )

#### 8.2.2.5 Niveles de FGF23 en pacientes con fosfato sérico por debajo y por encima de la mediana (<4.35 mg/dl vs. >4.35 mg/dl)

Dado que el fosfato es uno de los factores más importantes asociados con el aumento de FGF23, es importante saber si en pacientes con un control aceptable de fosfato sérico, existen otras variables que podrían enfocarse para lograr un mejor control de FGF23. Considerando que los niveles medianos de fosfato de la población total fueron comparables con el nivel superior de fosfato recomendado en pacientes en hemodiálisis<sup>16</sup> procedimos a dividir la población total de acuerdo a los niveles medianos de fosfato y analizar la distribución de las variables relacionadas con el metabolismo óseo mineral.

Los sujetos con niveles de fosfato superiores a 4.35 mg/dl eran más jóvenes y presentaban niveles más bajos de calcio iónico ( $P < 0.01$ ). Además, mostraban niveles superiores de hs-CRP ( $P < 0.01$ ), iPTH ( $P < 0.001$ ), iFGF23 ( $P < 0.001$ ) y cFGF23 ( $P < 0.001$ ) (Tabla 6).

Variable	Fosfato <4.35 mg/dL n=75	Fosfato >4.35 mg/dL n=75	P*
Edad (años) §	76.0 (61.0—84.0)	67.0 (57.0—79.0)	<0.01
Tiempo en diálisis (meses) §	53.7 (19.5—80.3)	41.2 (13.5—85.1)	0.38
hs-CRP (mg/l) §	5.6 (2.3—9.2)	8.5 (6.0—11.7)	<0.01
iCa (mEq/l) §	2.24 (2.14—2.30)	2.14 (2.04—2.28)	0.01
Fosfato (mg/dl) §	3.71 (3.40—4.08)	5.33 (4.94—5.94)	<0.001
iPTH (pg/ml) §	211.0 (121.0—362.0)	364.0 (201.0—560.5)	<0.001
25 (OH) D (ng/ml) §	8.2 (7.0—11.1)	8.1 (6.8—10.1)	0.34
1,25 (OH) <sub>2</sub> D (pg/ml) §	11.0 (3.17—12.5)	12.1 (8.6—16.1)	0.01
iFGF23 (pg/ml) §	223.0 (99.0—535.0)	907.0 (447.0—1600.0)	<0.001
cFGF23 (RU/ml) §	569.0 (242—965)	1523.0 (795.0—2616.0)	<0.001

**Tabla 6. Características bioquímicas de los pacientes de acuerdo a los niveles medianos de fosfato sérico inferiores o superiores a 4.35 mg/dl.** ¶ Media ± Desviación estándar (SD) § Mediana y rango intercuartílico (IQR)



8.2.2.6 Factores asociados al incremento de iFGF23 y cFGF23. Análisis de regresión lineal de acuerdo a los niveles medianos de fosfato sérico.

A. <i>iFGF23</i>						
Multivariable	<4.35 mg/dl (n=75)			>4.35 mg/dl (n=75)		
Variable	Beta <sup>¶</sup>	95% IC	P	Beta <sup>¶</sup>	95% IC	P
<b>Modelo 1</b>						
hs-CRP (g/l)	0.07	-0.15—0.37	0.39	0.21	0.02—0.65	0.03
iCa (mEq/l)	0.36	1.80—5.29	<0.001	0.14	-0.29—2.08	0.13
Fosfato (mg/dl)	0.57	0.86—1.65	<0.001	0.52	0.31—0.67	<0.001
<b>Modelo 2</b>						
hs-CRP (g/l)	-----	-----	-----	0.21	0.02—0.65	0.03
iCa (mEq/l)	0.36	1.80—5.29	<0.001	-----	-----	-----
Fosfato (mg/dl)	0.57	0.86—1.65	<0.001	0.52	0.31—0.67	<0.001
<b>Modelo 3</b>						
hs-CRP (g/l)	-----	-----	-----	0.21	0.02—0.65	0.03
iCa (mEq/l)	0.36	1.80—5.29	<0.001	-----	-----	-----
Fosfato (mg/dl)	0.57	0.86—1.65	<0.001	0.52	0.31—0.67	<0.001
B. <i>cFGF23</i>						
Multivariable	<4.35 mg/dl (n=75)			>4.35 mg/dl (n=75)		
Variable	Beta <sup>¶</sup>	95% IC	P	Beta <sup>¶</sup>	95% IC	P
<b>Modelo 4</b>						
hs-CRP (g/l)	0.47	0.33—0.80	<0.001	0.27	0.10—0.68	<0.001
Fosfato (mg/dl)	0.26	0.12—0.85	<0.01	0.42	0.18—0.52	<0.01
<b>Modelo 5</b>						
hs-CRP (g/l)	0.47	0.33—0.81	<0.001	0.28	0.15—0.67	<0.01
Fosfato (mg/dl)	0.26	0.11—0.83	0.01	0.32	0.11—0.42	<0.01
Edad (años)	-----	-----	-----	-0.26	-0.03— -0.06	<0.01
Tiempo en Diálisis (meses)	-----	-----	-----	0.36	0.004—0.01	<0.001
<b>Modelo 6</b>						
hs-CRP (g/l)	0.47	0.33—0.81	<0.001	0.28	0.15—0.67	<0.01
Fosfato (mg/dl)	0.26	0.12—0.85	<0.01	0.32	0.11—0.42	<0.01
Edad (años)	-----	-----	-----	-0.26	-0.03— -0.006	<0.01
Tiempo en Diálisis (meses)	-----	-----	-----	0.36	0.004—0.01	<0.001

**Tabla 7. Análisis de regresión lineal multivariable de acuerdo con los niveles séricos de fosfato estratificado como variable binaria. Determinantes de los niveles séricos altos de FGF23 en pacientes con fosfato por debajo de 4,35 mg / dl y por encima de 4,35 mg / dl. A) iFGF23, B) cFGF23. <sup>¶</sup> Coeficiente Beta estandarizado**

**Modelo 1:** ajustado por fosfato sérico, calcio sérico iónico y hs-CRP. (R<sup>2</sup> = 0,42 para el grupo con P <4,35 mg / dl y R<sup>2</sup> = 0,32 para el grupo con P > 4,35 mg / dl)

**Modelo 2:** Ajustado para el modelo 1 más edad, tiempo en diálisis, ferritina sérica, iPTH, 25 (OH) D y 1,25 (OH) 2D. (R<sup>2</sup> = 0,42 para el grupo con P <4,35 mg / dl)

**Modelo 3:** ajustado para el modelo 1 más la concentración de calcio en el líquido de diálisis, el uso de captadores de fosfato a base de calcio, captadores de fosfato sin calcio, paricalcitol, cinacalcet y eritropoyetina ( $R^2 = 0,47$  para el grupo con  $P < 4,35$  mg / dl y  $R^2 = 0,32$  para el grupo con  $P > 4,35$  mg / dl)

**Modelo 4:** ajustado para fosfato sérico, calcio sérico iónico y hs-CRP. ( $R^2 = 0,42$  para el grupo con  $P < 4,35$  mg / dl y  $R^2 = 0,32$  para el grupo con  $P > 4,35$  mg / dl)

**Modelo 5:** Ajustado para el modelo 1 más edad, tiempo en diálisis, ferritina sérica, iPTH, 25 (OH) D y 1,25 (OH) 2D. ( $R^2 = 0,42$  para el grupo con  $P < 4,35$  mg / dl)

**Modelo 6:** ajustado para el modelo 1 más la concentración de calcio en el líquido de diálisis, el uso de captadores de fosfato a base de calcio, captadores de fosfato sin calcio, paricalcitol, cinacalcet y eritropoyetina

En pacientes con fosfato sérico  $< 4,35$  mg/dl, la concentración sérica de fosfato y calcio iónico determinaron de forma independiente los niveles de iFGF23, mientras que los niveles séricos de fosfato y hs-CRP determinaron los niveles de cFGF23 (Tabla 7A). En pacientes con fosfato sérico  $> 4,35$  mg/dl, el iFGF23 se asoció de forma independiente con la concentración sérica de fosfato y hs-CRP, y no se correlacionó con el calcio iónico en suero (Tabla 7B). El fosfato sérico, la edad, el tiempo en diálisis y la hs-CRP sérica determinaron de forma independiente los niveles de cFGF23 en este grupo de sujetos. No existió asociación entre los valores de iPTH y la concentración de FGF23 (Tabla 7).

#### 8.2.2.7 Subgrupos de fosfato y FGF23

En vista de la estrecha relación entre el fosfato sérico y las diferentes isoformas de FGF23, y considerando que existían diferencias con respecto a los factores determinantes de cada una de las moléculas se procedió a realizar subgrupos de acuerdo a los niveles medianos de fosfato, iFGF23 y cFGF23. Los grupos conformados fueron los siguientes: Según los valores de iFGF23, los grupos fueron Bajo Fosfato/bajo iFGF23, bajo Fosfato/alto iFGF23, alto Fosfato/bajo iFGF23 y alto Fosfato/alto iFGF23. En relación con el cFGF23, los grupos fueron: bajo Fosfato/bajo cFGF23, bajo Fosfato/alto cFGF23, alto Fosfato/bajo cFGF23 y alto Fosfato/alto cFGF23.

Los pacientes más jóvenes mostraron los niveles más altos de fosfato, iFGF23 y cFGF23 ( $P < 0.001$ ). Los sujetos con concentraciones elevadas de fosfato y altos niveles de iFGF23 y cFGF23 eran aquellos con los niveles más elevados de hs-CRP ( $P < 0.001$  para ambos grupos) e iPTH ( $P < 0.001$  para ambos grupos). Interesantemente, el grupo de pacientes con bajo contenido de fosfato/alto cFGF23 también mostraron mayores niveles de hs-PCR y un mayor tiempo en diálisis (Tabla 8).

Variable	Fosfato e iFGF23					Fosfato y cFGF23				
	Bajo P/ Bajo iFGF23 (n=55)	Bajo P/ Alto iFGF23 (n=22)	Alto P/ Bajo iFGF23 (n=20)	Alto P/ Alto iFGF23 (n=53)	P*	Bajo P/ Bajo cFGF23 (n=53)	Bajo P/ Alto cFGF23 (n=22)	Alto P/ Bajo cFGF23 (n=22)	Alto P/ Alto cFGF23 (n=53)	P*
<b>Edad</b> (años) ¶	74.8 ± 12.8	64.0 ± 16.7	66.9 ± 15.2	65.5 ± 14.2	<0.001	72.4 ± 15.5	68.2 ± 14.5	71.4 ± 13.6	63.7 ± 14.0	<0.01
<b>BMI</b> (kg/cm) ¶	26.3 ± 5.96	27.2 ± 8.27	26.6 ± 4.34	26.3 ± 5.1	0.93	25.8 ± 6.45	28.5 ± 7.14	26.8 ± 3.43	28.5 ± 7.14	0.36
<b>Genero</b> (masculino; n, %)	30 (54.5)	11 (50.0)	14 (70.0)	30 (56.6)	0.58	29 (54.7)	10 (45.5)	18 (81.8)	28 (52.8)	0.07
<b>Índice charlson</b> ¶	3.0 (2.0—5.0)	4.0 (3.0—4.2)	4.0 (2.2—5.0)	3.0 (2.0—5.0)	0.46	3.0 (2.0—5.0)	4.0 (2.0—5.0)	4.0 (2.7—5.0)	3.0 (2.0—5.0)	0.70
<b>Calcio en Líquido 3 mEq/l</b> (n, %)	47 (85.5)	20 (90.9)	18 (90.0)	46 (86.8)	0.90	46 (86.8)	20 (90.9)	21 (95.5)	44 (83.0)	0.48
<b>Tiempo en diálisis</b> (meses) §	54.8 (27.3—80.2)	40.3 (15.4—85.8)	35.7 (6.6—67.3)	47.3 (15.5—86.8)	0.35	53.1 (18.7—79.5)	59.6 (21.6—85.8)	29.6 (6.8—48.6)	52.9 (15.5-89.9)	0.06
<b>Duración de Diálisis</b> (min) ¶	246.8 ± 14.3	248.7 ± 8.9	243.4 ± 15.3	247.3 ± 12.1	0.13	247 ± 12.5	249.6 ± 7.8	241.4 ± 18.7	247.2 ± 12.0	0.08
<b>Albumina</b> (g/l) ¶	3.68 ± 0.39	3.60 ± 0.26	3.83 ± 0.27	3.67 ± 0.41	0.12	3.66 ± 0.40	3.64 ± 0.26	3.80 ± 0.35	3.68 ± 0.38	0.13
<b>Hb</b> (g/l) ¶	11.1 ± 1.25	11.4 ± 1.16	11.1 ± 0.92	11.1 ± 1.48	0.91	11.3 ± 1.30	11.1 ± 1.0	11.3 ± 1.0	11.0 ± 1.43	0.73
<b>TSAT</b> (%) ¶	25.0 (20.0—35.0)	25.5 (22.0—31.0)	30.5 (20.0—39.2)	26.0 (20.0—35.0)	0.69	25.0 (20.0—30.5)	27.5 (22.7—39.5)	32.5 (23.7—41.0)	26.0 (19.0—32.0)	0.03
<b>Ferritina</b> (ng/l) §	466.0 (337.0—742.0)	453.0 (348.0—652.2)	383.0 (277.4—690.2)	545.0 (341.5—806.5)	0.47	440.0 (309.0—740.5)	471.5 (368.7—552.2)	612.0 (303.7—869.2)	436.0 (305.0—806.5)	0.82
<b>hs-CRP</b> (mg/l) §	5.4 (2.80-8.80)	6.5 (2.2-14.2)	6.8 (5.0-8.50)	9.50 (6.30-12.6)	<0.001	3.6 (2.1-7.1)	10.0 (6.9-16.3)	6.7 (5.42-8.2)	10.1 (6.3-12.7)	<0.001
<b>Ca</b> (mg/dl) ¶	8.82 ± 0.49	9.01 ± 0.53	8.63 ± 0.83	8.60 ± 0.72	0.03	8.83 ± 0.51	8.95 ± 0.48	8.86 ± 0.80	8.51 ± 0.72	0.02
<b>iCa</b> (mEq/l) §, ¶	2.20 ± 0.12	2.25 ± 0.13	2.15 ± 0.20	2.14 ± 0.18	0.03	2.20 ± 0.12	2.23 ± 0.12	2.21 ± 0.20	2.12 ± 0.18	0.02
<b>Fosfato</b> (mg/dl) <sup>h</sup> , §	3.53 ± 0.61	3.97 ± 0.30	5.20 ± 0.57	5.88 ± 1.32	<0.001	3.53 ± 0.59	3.86 ± 0.35	5.18 ± 0.51	5.87 ± 1.33	<0.001
<b>FA</b> (U/l) §	91.0 (71.0—119)	96.0 (73.5—110.5)	92.0 (68.7—122.7)	86.0 (70.5—127.5)	0.99	96.0 (74.5—120.0)	81.5 (68.0—107.7)	80.0 (67.5—112.7)	91.0 (71.0—130.5)	0.31
<b>iPTH</b> (pg/ml) §	167.0 (107.0—359.0)	290.0 (157.0—382.0)	329.0 (188.2—425.0)	400.0 (201.5—689.5)	<0.001	170.0 (105.5—360.5)	255.0 (126.0—370.2)	274.0 (206.5—394.0)	418.0 (191.0—689.5)	<0.001
<b>25(OH)D</b> (ng/ml) ¶	8.4 (7.5—11.6)	7.4 (6.5—10.0)	8.4 (7.0—10.0)	8.0 (6.7—11.3)	0.69	9.1 (7.5—12.2)	7.8 (5.0—10.0)	8.1 (6.2—9.9)	8.0 (6.8—10.7)	0.69
<b>1,25 (OH)<sub>2</sub> D</b> (pg/ml) ¶	11.0 (4.0—12.2)	11.3 (2.6—13.0)	13.2 (5.3—18.4)	12.0 (9.0—16.3)	0.05	11.0 (3.3—13.6)	6.5 (2.7—12.2)	11.4 (5.0—16.7)	12.3 (9.0—16.0)	0.17
<b>iFGF23</b> (pg/ml) §	148.0 (75.0-262.0)	1072.0 (620.01466.2)	282.5 (169.2-412.7)	1357.0 (884.0-2424.0)	<0.001	158.0 (82.5—414.0)	574.5 (281.2—1358.7)	415.5 (223.2—580.0)	1179.0 (788.5—2424.0)	<0.001
<b>cFGF23</b> (RU/ml) §	401.0 (183.0—780.0)	969.5 (596.2--1797.7)	665.5 (404.5-1050.0)	1995.0 (1188.0--3444.5)	<0.001	340.0 (179.5—614.0)	1477.0 (1145.7—2128.5)	575.5 (387.7—727.0)	2066.7 (1400.5—4135.5)	<0.001

**Tabla 8. Subgrupos de fosfato sérico y FGF23 contrastados en términos de variables evaluadas. El fosfato sérico y iFGF23 y cFGF23 se estratificaron según sus valores medianos y se clasificaron en cuatro grupos diferentes. ¶** Media ± Desviación estándar (SD). **§** Mediana y rango intercuartílico (IQR)

### 8.2.2.8 Contribución proporcional de cada variable sobre FGF23

El grado de influencia o los pesos relativos (*RWs*, expresados en porcentaje) de las diversas variables independientes en los niveles séricos de iFGF23 y cFGF23 se detallan en la figura 7 y en la tabla 9. En pacientes con fosfato sérico <4,35 mg/dl, la concentración de fosfato sérico contribuyó al 50.3% a los niveles de iFGF23, la concentración sérica de calcio iónico contribuyó 24.9% y la *hs*-PCR 4.4%. Por el contrario, en pacientes con fosfato sérico > 4,35 mg/dl, aunque el fosfato sérico continuó siendo el factor más influyente, la *hs*-CRP contribuyó más que el calcio iónico (10,6% frente al 1,9%) (Fig. 7A). Con respecto al cFGF23, el 81,3% del peso relativo fue determinado por el del fosfato sérico, la *hs*-CRP y el tiempo en diálisis (Fig. 7B y Tabla 8). De resaltar, los niveles elevados de cFGF23 fueron más dependientes de la *hs*-PCR-hs que del calcio sérico iónico en pacientes con fosfato sérico <4,35 mg/dl.

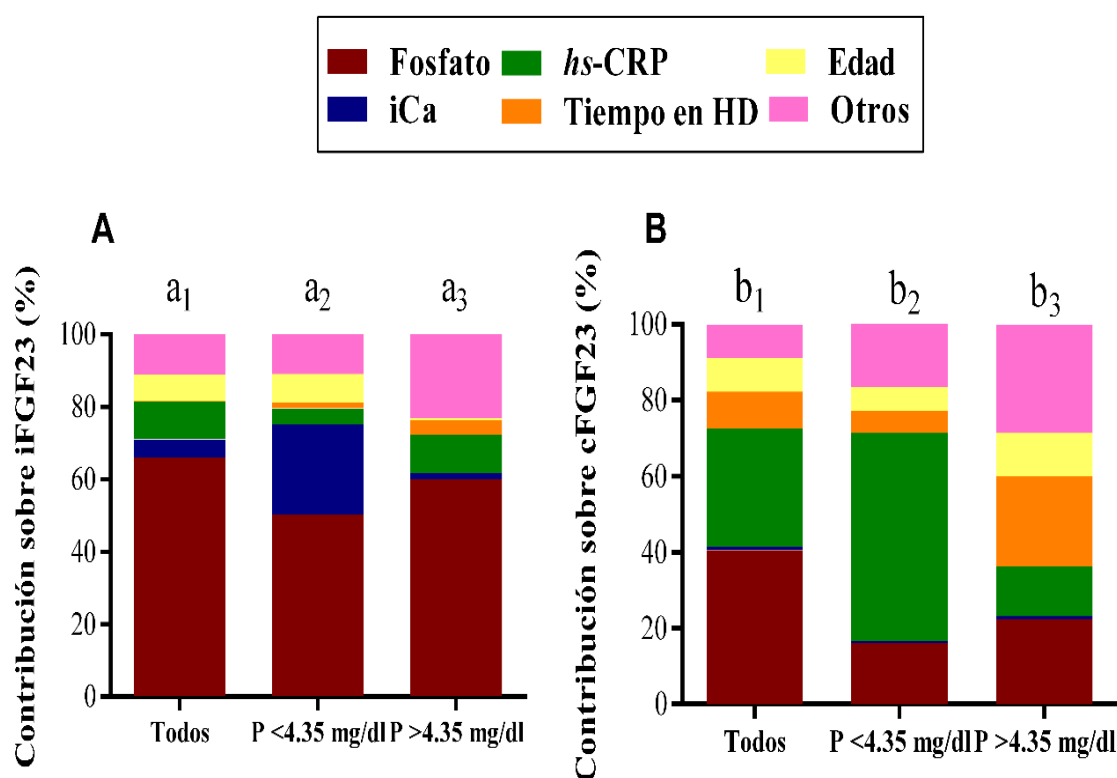


Figura 7. El grado de contribución (expresado en porcentaje) de las diversas variables independientes sobre los niveles séricos de iFGF23 (A) y cFGF23 (B). Se calculó la contribución proporcional (pesos

relativos; *RWs*) de cada una de los independientes. El test de significación estadística de los *RWs* se realizó mediante el método descrito por Johnson y Tonidandel<sup>317,318</sup>. El test de significación estadística de los *RWs* se basa en la descripción de los de los intervalos de confianza (CI); Si se excluye el cero del intervalo de confianza, el *RW* es significativo. La prueba de significación de *RWs* se realizó solo para variables que mostraron significación estadística en el análisis de regresión. La contribución proporcional de la iPTH sérica, 25 (OH) D, 1,25 (OH) 2 D, La ferritina, la concentración de calcio en el líquido de diálisis, el uso de cinacalcet o paricalcitol y de captadores de fosfato con base cálcica o sin base cálcica se describen como "otros" debido a que su contribución individual fue limitada. La tabla 8 muestra la contribución proporcional detallada de cada variable para toda la población y separada de acuerdo con los niveles de fosfato por debajo o por encima de la mediana. Las letras minúsculas sobre las columnas identifican los diferentes grupos analizados, la población general a1-b1, los pacientes con P<4,35 mg/dl (a2-b2) y pacientes con P>4,35 mg/dl (a3-b3) para iFGF23 y cFGF23 respectivamente. Para iFGF23 (A) los *RWs* del fosfato sérico (*IC para la significación* 0.24 ± 0.47), el calcio iónico [iCa] (*IC para la significación* 0.001 ± 0.07) y la hs-CRP (*IC para la significación* 0.01 ± 0.10) fueron significativamente diferentes en toda la población (a1). Por otra parte, el *RWs* el fosfato fue significativamente superior al *RW* del iCa, de la hs-CRP y de la edad. En pacientes con fosfato <4,35 mg/dl (a2), Los *RWs* del iCa en suero (*IC para la significación* 0.01 ± 0.26) y del fosfato (*IC para la significancia* 0.14 ± 0.41) fueron significativos en comparación con las otras variables. Es de resaltar que, no hubo diferencias entre los *RWs* del fosfato y de iCa en este grupo de pacientes (a2). En pacientes con fosfato por encima de la mediana (P> 4,35 mg/dl) [a3], solo los *RWs* de la hs-CRP (*IC para la significación* 0.00 ± 0.12) y del fosfato (*IC para la significación* 0.06 ± 0.45) fueron significativos. El *RW* del fosfato (59.9%) fue significativamente superior al *RW* de la edad (*IC para la significación* -0.45—0.04), de la hs-CRP (*IC para la significación* -0.44—0.02), y del iCa (*IC para la significación* -0.49—0.07). (B) Con respecto al cFGF23, en la población general (b1) el fosfato sérico se mantuvo como el principal contribuyente (40,6%). Junto con el fosfato (*IC para la significación* 0.18—0.34), los *RWs* de la hs-CRP (*IC para la significación* 0.10—0.26), del tiempo en diálisis (*IC para la significación* 0.01—0.14) y la edad (*IC para la significación* 0.008 ± 0.12) también fueron significativos. Los *RWs* del fosfato y hs-CRP no fueron diferentes (*IC para la significación* -0.20—0.04). La contribución de la hs-CRP fue mucho más importante que la del iCa (31.0 vs 1.0%); (b1). En el grupo de pacientes con P <4,35 mg/dl (b2), la hs-CRP (*IC para la significación* 0,09—0,40) y el fosfato (*IC para la significación* 0,02—0,20) fueron los dos *RWs* significativos. La hs-CRP contribuyó mucho más que el fosfato, la edad y el tiempo en diálisis. Finalmente, en el grupo de pacientes con P> 4,35 mg/dl (b3), el tiempo en diálisis (*IC para la significación* 0,05—0,32), la hs-CRP (*IC para la significación* 0.01—0.17) y el fosfato sérico (*IC para la significación* 0.03—0.31) fueron los *RWs* estadísticamente significativos. No hubo diferencias entre los *RWs* de estas tres variables.

Variable	iFGF23			cFGF23		
	Todos (n=150) RW**	P<4.35 mg/dl (n=75) RW**	P>4.35 mg/dl (n=75) RW**	Todos (n=150) RW**	P<4.35 mg/dL (n=75) RW**	P>4.35 mg/dL (n=75) RW**
Edad (años)	7.2	7.8	0.5	8.7	6.3	11.5
Tiempo en Diálisis (meses)	0.2	1.6	3.9	9.7	5.7	23.7
<b>Calcio en Líquido</b>						
2.5 mEq/L	ref					
3 mEq/L	0.1	0.2	3.9	0.7	0.9	5.6
hs-CRP (mg/l)	10.4	4.4	10.6	31.0	54.9	12.9
iCa (mEq/l)	5.0	24.9	1.9	1.0	0.3	1.0
Fosfato (mg/dl)	66.0	50.3	59.9	40.6	16.2	22.3
iPTH (pg/ml)	3.9	1.6	0.4	3.1	0.7	1.5
25 (OH) D (ng/ml)	0.6	1.2	2.3	0.6	2.4	2.9
1,25 (OH) <sub>2</sub> D (pg/ml)	0.8	0.4	2.4	0.5	0.5	2.6
Ferritina (ng/l)	0.3	0.3	0.5	0.2	2.6	5.3
<b>Cinacalcet</b>						
No	ref					
Sí	0.3	2.6	0.3	1.5	0.4	1.1
<b>Paricalcitol</b>						
No	ref					
Sí	1.4	2.4	1.5	0.5	5.5	4.7
<b>Captoreadores Cálculos</b>						
No	ref					
Sí	2.2	1.0	8.0	0.5	2.1	1.5
<b>Captoreadores no cálculos</b>						
No	ref					
Sí	0.8	0.5	2.9	0.6	0.2	0.4
<b>Eritropoyetina</b>						
No	ref					
Sí	0.8	0.8	1.0	0.8	1.3	3.0

**Tabla 9. La contribución relativa o pesos relativos (RWs) de todas las variables asociadas clínicamente con un aumento en FGF23. La contribución relativa de cada variable sobre iFGF23 o cFGF23 en la población general (n = 150) y según la mediana de fosfato sérico (<4.35 mg/dl o P>4.35 mg/dl). Algunas de las variables no mostraron significación estadística en el análisis de regresión lineal, sin embargo, se muestra su RWs. \*\*RWs: Contribución relativa de cada variable sobre la el coeficiente de regresión en combinación con las otras variables incluidas en el modelo.**

### **8.2.3 Conclusiones específicas**

- El fosfato es el principal factor asociado al incremento de FGF23
- La proteína C-reactiva, como marcador de inflamación, se asocia al incremento de ambas moléculas de FGF23, aunque su contribución sobre cFGF23 es superior a iFGF23.
- Los niveles de Calcio se asocian al incremento de iFGF23, principalmente cuando los niveles de fosfato sérico se encuentran dentro del rango de la normalidad.
- El calcio iónico no tiene ninguna contribución sobre los niveles de cFGF23.
- El tiempo de permanencia en diálisis, como marcador subrogado de un proceso inflamatorio de mayor duración, se asocia al incremento de cFGF23, mientras que no tiene ninguna influencia sobre los niveles de iFGF23.
- La edad avanzada parece asociarse de forma negativa con FGF23, de tal forma que los pacientes de mayor edad presentaban niveles inferiores de FGF23, probablemente sugiriendo una menor ingesta de proteínas y por tanto de fosfato.
- Es probable que en un futuro cercano la molécula cFGF23 pueda ser considerada un marcador subrogado del proceso inflamatorio.
- De acuerdo con nuestros resultados, los factores reguladores del incremento de iFGF23 y cFGF23 no coinciden en su totalidad.
- Se recomienda que los estudios que incluyan a FGF23 dentro de sus determinaciones deben determinar ambas moléculas, y la interpretación de los resultados dependerá del contexto en el que se realicen los estudios.

## **9. CAPITULO 2**

### **9.1 CAPACIDAD DEL FILTRO DE HEMODIÁLISIS PARA ELIMINAR FGF23 DURANTE UNA SESIÓN DE HEMODIÁLISIS.**

#### **9.1.1 Métodos**

##### **9.1.1.1 Tipo de estudio**

Estudio transversal observacional

##### **9.1.1.2 Población**

Para la consecución de este objetivo se incluyeron 5 pacientes prevalentes en hemodiálisis. Los criterios de inclusión y exclusión se resumen a continuación.

9.1.1.2.1 Criterios de inclusión: Los descritos en el apartado 7.1.1.1. Adicionalmente, todos debían estar hemodiálisis de alto flujo (HF-HD) con una concentración de calcio en el líquido de diálisis de 3 mEq/l. Ninguno de los pacientes debía recibir tratamiento con cinacalcet o paricalcitol en el momento del estudio.

9.1.1.2.2 Criterios de Exclusión: Los descritos en apartado 7.1.1.2.

##### **9.1.1.3 Determinaciones sanguíneas y demográficas**

Para la consecución de este objetivo se realizaron determinaciones sanguíneas secuenciales a lo largo de la sesión de diálisis. Las muestras sanguíneas fueron extraídas



de acuerdo al siguiente protocolo: pre-diálisis (pre-HD), a los 5 minutos del inicio de la sesión antes del filtro de hemodiálisis (pre-filtro) y después del filtro (post-filtro) y antes de finalizar la sesión de diálisis (post-HD). Los niveles de fosfato sérico, calcio iónico y ambas moléculas de FGF23 se determinaron en cada uno de estos tiempos. Los niveles de PTH solo se determinaron en las muestras pre-HD y post-HD. Las determinaciones post-HD de FGF23 y PTH fueron corregidas de acuerdo al volumen ultrafiltrado durante la sesión de diálisis con la fórmula de Bergstrom<sup>319</sup>. El porcentaje de reducción se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:  $\text{Porcentaje de reducción} = (\text{FGF23-preHD} - \text{FGF23 post-HD}) / (\text{FGF23-pre-HD}) \times 100$ . La misma fórmula se aplicó para calcular el porcentaje de reducción de las otras variables analizadas. Las determinaciones pre-Filtro y post-Filtro no fueron ajustadas al volumen de ultrafiltración dado que la UF se mantuvo en 0 durante los primeros 10 minutos de la sesión.

Cada sesión de HF-HD se realizó con una membrana de helixona Cordiax Fx60 (Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Alemania) con una superficie de 1,6 m<sup>2</sup>. Todos los pacientes fueron dializados contra un líquido de diálisis que contenía 32–36 mEq/l de bicarbonato, 1 mEq/l de magnesio, 2 mEq/l de potasio y 3 mEq/L de calcio.

#### **9.1.1.4 Análisis estadístico**

Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (SD) o mediana (rango intercuartílico, IQR) según corresponda. Los datos categóricos se expresan como frecuencias y proporciones. Las diferencias grupales para comparaciones no paramétricas numéricas se determinaron mediante los test estadísticos de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. Por el contrario, las comparaciones paramétricas numéricas se realizaron utilizando el test estadístico de Wilcoxon para dos grupos y el test estadístico de Friedman para comparar varios grupos.

## 9.1.2 Resultados

### 9.1.2.1 Características generales de la población estudiada

Las características generales y clínicas de la población incluida en este estudio se describen en la tabla 10. En total se analizaron muestras sanguíneas de 5 sujetos con una edad media de  $68.8 \pm 12.5$  años. El 60% ( $n=3$ ) eran hombres.

Variable	<i>n=5</i>
<b>Edad</b> (años) <sup>¶</sup>	$68.8 \pm 12.5$
<b>BMI</b> (kg/cm <sup>2</sup> ) <sup>¶</sup>	$24.9 \pm 3.4$
<b>Genero</b> (masculino; n, %)	60.0 (3)
<b>Etiología ERC</b>	
<i>Desconocida</i> (%)	40.0
<i>Diabetes</i> (%)	0
<i>Hipertensión</i> (%)	0
<i>Glomerulonefritis</i> (%)	0
<i>Poliquistosis</i> (%)	40.0
<i>Otras</i> (%)	20.0
<b>Co-morbilidades</b>	
<i>Hipertensión</i> (%)	80.0
<i>Diabetes</i> (%)	20.0
<i>Enfermedad Coronaria</i> (%)	0
<i>Enfermedad cerebrovascular</i> (%)	0
<b>Indice Charlson</b>	3.0 (2.5—4.5)
<b>Acceso Vascular</b>	
<i>AV Fistula, n (%)</i>	80.0 (4)
<i>Cateter, n (%)</i>	0
<i>Injerto Gore-Tex, n (%)</i>	20.0 (1)
<b>Tiempo en Diálisis</b> (meses) <sup>§</sup>	35.1 (8.6—93.1)
<b>Tiempo efectivo sesión</b> (mins) <sup>¶</sup>	$243.8 \pm 3.4$
<b>Qb efectivo</b> (mil/min) <sup>¶</sup>	$482.6 \pm 34.7$
<b>Qd efectivo</b> (mil/min) <sup>¶</sup>	$492.6 \pm 36.7$
<b>Kt</b> (litros/sesión) <sup>¶</sup>	$64.9 \pm 3.5$
<b>KtV</b> <sup>¶</sup>	$2.1 \pm 0.6$
<b>UF total</b> (l/sesión) <sup>¶</sup>	$1.8 \pm 0.9$

**Tabla 10. Características generales de la población incluida (n=5).** <sup>¶</sup> Media y desviación estándar. <sup>§</sup> Mediana y rango intercuartílico

### 9.1.2.2 Cambios secuenciales en calcio sérico, fosfato e iPTH

Tal y como se explicó detalladamente en el apartado de métodos, se extrajeron muestras de sangre para su análisis pre-HD, a los 5 minutos pre-Filtro y post-Filtro y post-HD.

De forma general, los niveles de calcio fueron superiores al final de la sesión de diálisis en comparación con los niveles pre-HD ( $P < 0.01$ ; Tabla 11, figura 8A). Los niveles de fosfato descendieron progresivamente a lo largo de la sesión de diálisis con una media de descenso del  $-33.5 \pm 26.9\%$  ( $P < 0.01$ ; tabla 11, figura 8B). Por otro lado, los niveles de iPTH descendieron una mediana de  $-75.5$  ( $-88.1$ — $-45.4$ ), ( $P = 0.04$ , figura 8C).

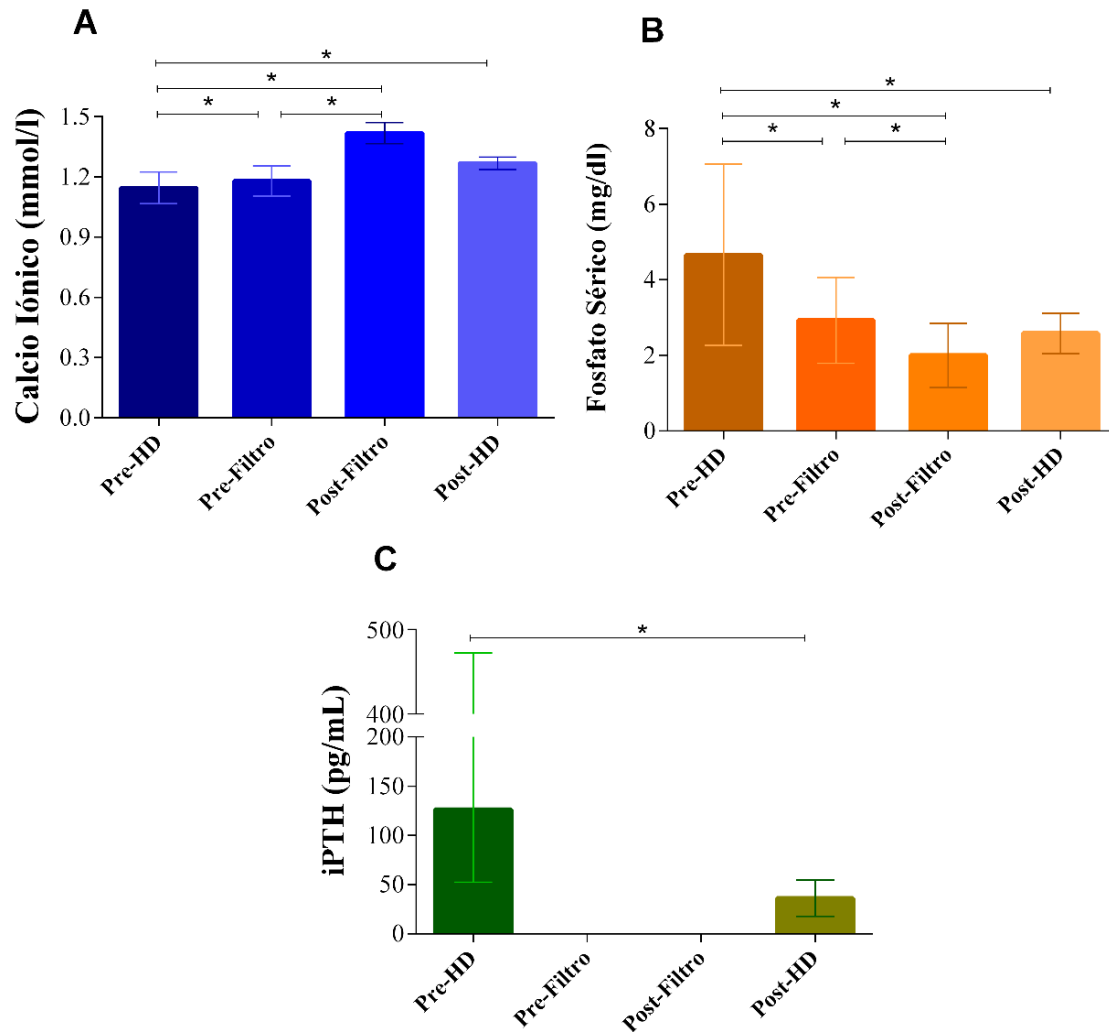
Variable	Pre-HD	Pre-Filtro	Post-Filtro	Post-HD	P*
<b>Calcio</b> (mmol/l) ¶	$1.14 \pm 0.07$	$1.18 \pm 0.07^a$	$1.41 \pm 0.05^{b,c}$	$1.26 \pm 0.03$	$<0.01$
<b>Fosfato</b> (mg/dl) ¶	$4.6 \pm 2.4$	$2.9 \pm 1.1^a$	$1.9 \pm 0.8^{b,c}$	$2.5 \pm 0.5^d$	$<0.01$
<b>iPTH</b> (mean) §	126.0 (52.5—472.5)	-----	-----	30.8 <sup>d</sup> (20.6—53.8)	0.04
<b>1,25 (OH)<sub>2</sub> D</b> (pg/ml) ¶	$7.6 \pm 1.9$	-----	-----	-----	ND
<b>25(OH)D</b> (ng/ml) ¶	$6.1 \pm 4.4$	-----	-----	-----	ND
<b>iFGF23</b> (pg/ml) §	223.0 (136.0—403.5)	233.0 (136.0—394.0)	219.0 (114.0—452.0)	120.6 <sup>d</sup> (37.6—265.8)	0.02
<b>cFGF23</b> (RU/ml) §	524.0 (303.5—1270.0)	468.0 (259.5—1723.0)	368.0 (94.0—2160.0)	143.0 <sup>d</sup> (59.5—629.5)	0.06

**Tabla 11. Cambios secuenciales de las variables estudiadas.** Los niveles de calcio, fosfato, iFGF23 y cFGF23 se determinaron en cada uno de los tiempos. Los niveles de iPTH solo se analizaron en las muestras pre-HD y post-HD. Los niveles de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D y de 25 (OH) D solo se determinaron en la muestra pre-HD. \* *Test de Friedman para las comparaciones globales.* <sup>a</sup> *Pre-HD vs pre-Filtro* ( $P < 0.05$ ), <sup>b</sup> *pre-HD vs post-Filtro* ( $P < 0.05$ ), <sup>c</sup> *pre-Filtro vs post-Filtro* ( $P < 0.05$ ), <sup>d</sup> *pre-HD vs post-HD* ( $P < 0.05$ ).

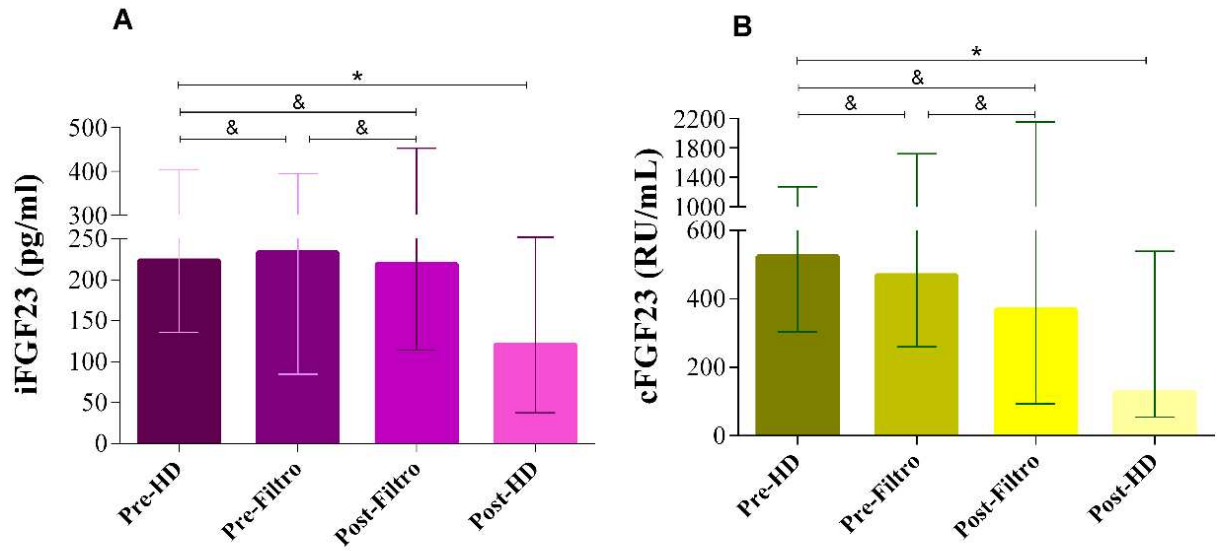
### 9.1.2.3 Efecto de la diálisis sobre FGF23

No se observaron diferencias entre los niveles de iFGF23 en las determinaciones pre-HD, pre-Filtro y post-Filtro (Figura 9A). Sí que se observaron diferencias entre las muestras pre-HD y post-HD con una mediana de reducción de  $-45.8\%$  ( $-66.3$ — $-34.1$ ) (Figura 9A).

Los niveles de cFGF23 descendieron progresivamente a lo largo de la sesión de diálisis, aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras pre-HD y pre-Filtro ( $P=0.68$ ), pre-HD y post-Filtro ( $P=0.68$ ) y pre-Filtro y post-Filtro ( $P=0.68$ ) (Figura 9B). Si existieron diferencias entre los niveles pre-HD y post-HD con una mediana de reducción del 71.3% (-71.1— -55.0) ( $P=0.04$ ; figura 9B).



**Figura 8.** Niveles de calcio, fosfato e iPTH a lo largo de la sesión de diálisis. Se observa de forma comparativa los cambios pre-HD, pre-Filtro, post-Filtro y post-HD. Las barras expresan la media y las líneas la desviación estándar. Para PTH solo se determinaron valores pre-HD y post-HD. \*  $P<0.05$ . &  $P>0.05$ .



**Figura 9. Niveles de iFGF23 (A) y cFGF23 (B). Se observa de forma comparativa los cambios pre-HD, pre-Filtro, post-Filtro y post-HD. Las barras expresan la mediana y las líneas el rango intercuartílico.**  
 \*  $P < 0.05$ . &  $P > 0.05$ .

### **9.1.3 Conclusiones específicas**

- El diferente perfil de cambio de iFGF23 y cFGF23 podría depender de su diferente peso molecular.
- Aunque nuestros resultados muestran que ambas moléculas de FGF23, iFGF23 y cFGF23, se reducen durante la sesión de hemodiálisis de alto flujo, es probable que el cambio en iFGF23 dependa de cambios en otras variables del metabolismo óseo-mineral. Por el contrario, de acuerdo al peso molecular de los fragmentos de cFGF23, y su reducción progresiva a lo largo de la sesión de hemodiálisis de alto flujo sugiere que su reducción puede estar determinada por el aclaramiento de la molécula a través del dializador.
- Se requiere un mejoramiento en los ensayos de determinación de FGF23 que permitan su medición validada en muestras biológicas diferentes al plasma y suero.

## **10. CAPITULO 3**

### **10.1 CAMBIOS AGUDOS DE FGF23 DURANTE UNA SESIÓN DE HEMODIÁLISIS Y SUS DETERMINANTES**

Dado que los resultados del apartado anterior sugieren que ambas moléculas de FGF23 se reducen a lo largo de la sesión de diálisis, procedimos a realizar un estudio cruzado en 15 pacientes para comparar los cambios agudos en FGF23 después de diferentes líquidos de diálisis que contenían 3 mEq/l o 2.5 mEq/l de calcio en dos sesiones diferentes de HD espaciadas por un intervalo de una semana. En un intento de discernir si la reducción de ambas moléculas de FGF23 estaba determinada por los cambios en los niveles de fosfato, calcio o PTH séricos decidimos utilizar diferentes concentraciones de calcio en el líquido de diálisis que inducirían cambios sustanciales en el calcio sérico y la PTH. A priori, los cambios esperables en los niveles de fosfato sérico deberían ser comparables independientemente de la concentración de calcio. Se controlaron el tiempo de diálisis, el Qb y el Qd con el fin de que estas variables no afectaran los resultados.

#### **10.1.1 Métodos**

##### **10.1.1.1 Tipo de estudio**

Estudio cruzado abierto

##### **10.1.1.2 Población**

Para la consecución de este objetivo se incluyeron 15 pacientes prevalentes en hemodiálisis. Los criterios de inclusión y exclusión se resumen a continuación.

10.1.1.2.1 Criterios de inclusión: Los descritos en el apartado 5.1.2. Además, Todos debían estar en hemodiálisis de alto flujo (HF-HD) con una concentración de calcio en el líquido de diálisis de 3 mEq/l. Ninguno de los pacientes debía recibir tratamiento con cinacalcet o paricalcitol al inicio del estudio ni durante su seguimiento.

10.1.1.2.1 Criterios de exclusión: Los descritos en apartado 5.1.2.

### **10.1.1.3 Determinaciones sanguíneas y demográficas**

Las muestras sanguíneas fueron extraídas pre-HD y post-HD. Los niveles de fosfato sérico, calcio iónico, ambas moléculas de FGF23 y la iPTH se determinaron en las muestras pre-HD y post-HD.

Cada sesión de HF-HD se realizó con una membrana de helixona Cordiax Fx60 (Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Alemania) con una superficie de 1,6 m<sup>2</sup>. Todos los pacientes fueron dializados con un líquido de diálisis que contenía 32–36 mEq/l de bicarbonato, 1 mEq/l de magnesio y 2 mEq/l de potasio. Los parámetros de eficacia de la diálisis fueron similares entre los dos períodos. Se calculó el cambio porcentual medio en los niveles plasmáticos de calcio, fosfato, iPTH, iFGF23 y cFGF23. Los valores de iFGF23, cFGF23 e iPTH post-HD se corrigieron por los cambios del volumen extracelular en función de las diferencias en los pesos pre-HD (BW<sub>pre</sub>) y post-HD (BW<sub>post</sub>) de acuerdo con la fórmula de Bergstrom <sup>319</sup>. Los niveles de 25 (OH) D y 1,25 (OH)<sub>2</sub> D se determinaron exclusivamente en las muestras pre-HD. El porcentaje de reducción se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: Porcentaje de reducción= (FGF23-preHD – FGF23 post-HD)/(FGF23-pre-HD) X 100. La misma fórmula se aplicó para calcular el porcentaje de reducción de las otras variables analizadas.



#### **10.1.1.4 Análisis estadístico**

Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (SD) o mediana (rango intercuartílico, IQR) según corresponda. Los datos categóricos se expresan como frecuencias y proporciones. La prueba de correlación de Spearman se utilizó para evaluar las correlaciones entre dos variables numéricas. Las diferencias grupales para comparaciones no paramétricas numéricas se determinaron mediante los test estadísticos de Mann-Whitney y la prueba no paramétrica de Wilcoxon. La prueba de correlación de Spearman se utilizó para evaluar las correlaciones entre dos variables numéricas.

El siguiente paso incluyó la realización de modelos de regresión lineal (procedimiento de selección por pasos hacia adelante) para examinar los factores que determinan los cambios en los niveles séricos de iFGF23 y cFGF23. Las variables que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante y otras consideradas clínicamente relevantes se incluyeron en el análisis multivariante.

### **10.1.2 Resultados**

#### **10.1.2.1 Características generales de la población estudiada**

La tabla 12 describe las características basales de los pacientes. La duración de la sesión de diálisis, el Qb efectivo, el Qd efectivo, la Uf total y los valores de hs-PCR, ferritina y TSAT eran comparables al inicio de cada una de las sesiones de diálisis realizadas sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las comparaciones.

Variable	[Ca] líquido de diálisis 2.5 mEq/l	[Ca] líquido de diálisis 3 mEq/l
Edad (años) ¶	57.3 ± 14.3	
BMI (kg/cm²) ¶	26.04 ± 2.03	
Genero (masculino; n, %)	8 (53.33)	
Etiología ERC		
Desconocida (%)	12.1	
Diabetes (%)	12.1	
Hipertensión (%)	6.1	
Glomerulonefritis (%)	3	
Poliquistosis (%)	6.1	
Otras (%)	6.1	
Co-morbilidades		
Hipertensión (%)	15 (100)	
Diabetes (%)	7 (46.6)	
Enfermedad Coronaria (%)	2 (13.3)	
Enfermedad cerebrovascular (%)	2 (13.3)	
Tipo de Acceso vascular		
AV Fistula, n (%)	13 (86.6)	
Catóter, n (%)	2 (13.3)	
Injerto Gore-Tex, n (%)	-----	
Tiempo en Diálisis (meses) <sup>b, §</sup>	57.03 (17-89)	
Tiempo efectivo sesión (mins) <sup>§</sup>	246.2 ± 7.3	244.6 ± 6.8
Qb efectivo (mil/min) ¶	466.9 ± 28.0	460.5 ± 34.5
Qd efectivo (mil/min) ¶	479.3 ± 23.5	470.1 ± 32.8
Kt (litros/sesión) ¶	63.5 ± 2.9	62.1 ± 4.0
KtV ¶	2.2 ± 0.5	2.1 ± 0.6
UF total (l/session)	2.0 ± 0.6	2.0 ± 0.7
hs-CRP (mg/l) <sup>§</sup>	3.0 (1.0—7.0)	5.80 (1.0—8.5)
Ferritina (mg/dl) <sup>§</sup>	583.0 (290.0—739.0)	561.0 (305.0—756.0)
TSAT (%) <sup>§</sup>	31.0 (24.5—43.0)	32.0 (21.0—50.0)

**Tabla 12. Características basales de los pacientes incluidos en el estudio cruzado abierto (n=15).** ¶ media y DS. § Median y rango intercuartílico (IQR).

#### 10.1.2.2 Cambios en calcio, fosfato e iPTH

Los niveles de calcio sérico se mantuvieron estables o tendieron a descender tras la diálisis con una concentración de calcio en el líquido de 2.5 mEq/l, mientras que sus niveles se incrementaron al final de la sesión de diálisis tras la exposición a una concentración de calcio de 3 mEq/l ( $P<0.001$ ; tabla 13) con un cambio medio del 11.2% ( $P<0.001$ ; tabla 14, figura 10A). Los cambios observados en los niveles de fosfato sérico fueron similares independientemente de la concentración de calcio utilizado en el líquido

de diálisis. De hecho, porcentualmente, el cambio de fosfato sérico fue del 50.0% cuando los pacientes se dializaron con un líquido que contenía 2.5 mEq/l de calcio y del 46.4% cuando se expusieron a un calcio de 3 mEq/l (tabla 14, figura 10B).

En relación a los niveles de PTH, estos apenas se modificaron tras la diálisis con una concentración baja de calcio ( $P=0.33$ ; tabla 13), mientras que tras la diálisis con una concentración de calcio de 3 mEq/l en el líquido de diálisis se redujeron una media del 71.4% (Tabla 14; figura 10C).

#### 10.1.2.3 Cambios en FGF23

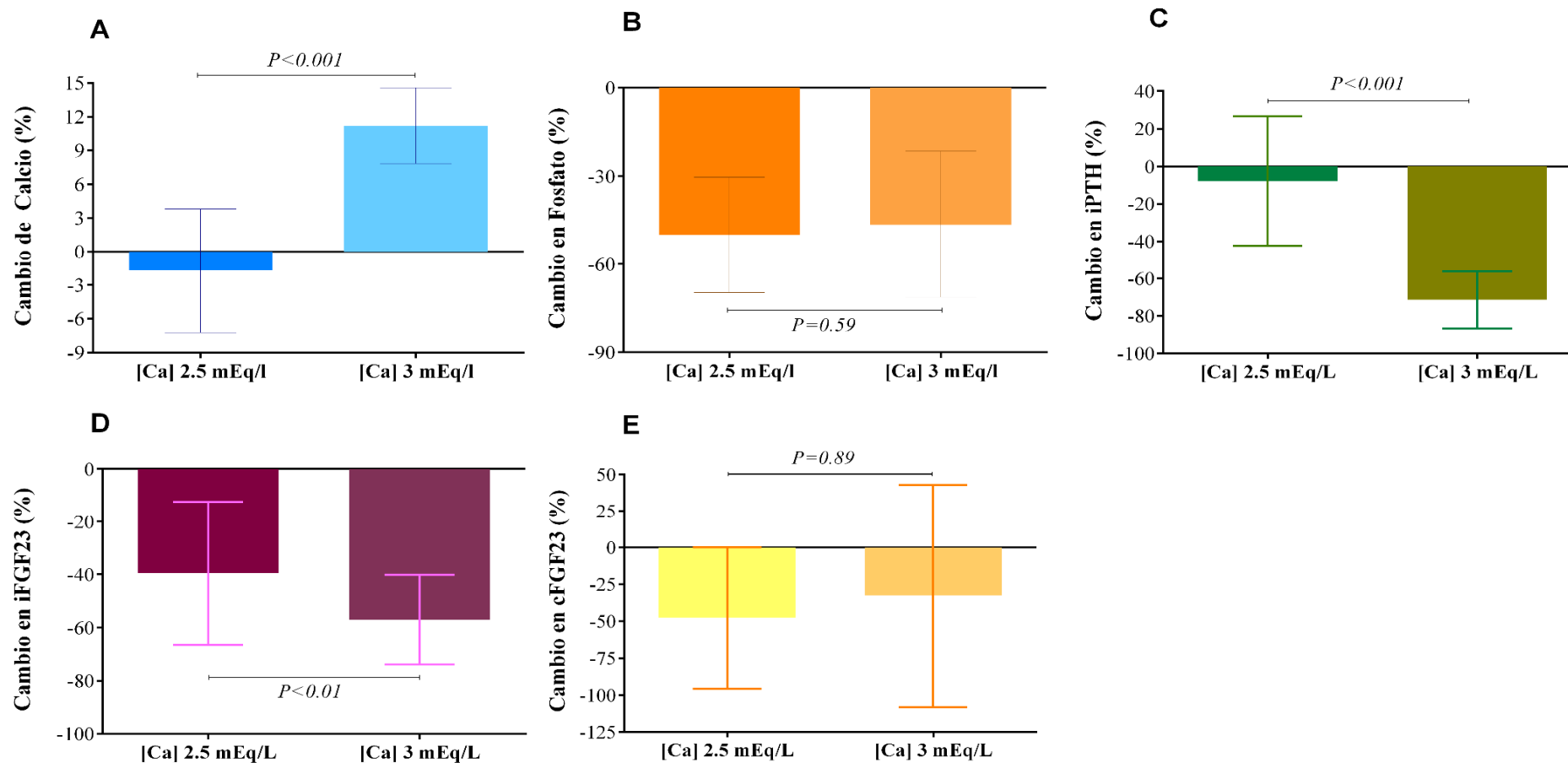
Los niveles de iFGF23 intacto y c-terminal eran comparables al inicio de cada sesión de diálisis evaluada ( $P=0.21$  para iFGF23 y  $P=0.15$  para cFGF23). Independientemente de la concentración de calcio en el líquido de diálisis, ambos fragmentos se redujeron significativamente (Tabla 13). Sin embargo, tras calcular el porcentaje de cambio de cada molécula, observamos que el porcentaje de descenso de iFGF23 fue diferente cuando se compararon ambas sesiones de diálisis con concentraciones de calcio diferentes. Mientras que tras la sesión donde se utilizó una concentración de calcio de 2.5 mEq/l descendió una media del  $39.4 \pm 27.1\%$ , cuando se utilizó una concentración de calcio de 3 mEq/l, iFGF23 descendió una media de  $57.0 \pm 16.8\%$  ( $P<0.01$ ; tabla 14, figura 10D). En relación a cFGF23, su reducción porcentual fue similar en los dos procedimientos ( $57.0 \pm 16.8\%$  contra  $57.0 \pm 16.8\%$ ; tabla 14, figura 10E).

Variable	[Ca] líquido de diálisis 2.5 mEq/l			[Ca] líquido de diálisis 3 mEq/l		
	Pre-HD	Post-HD	P*	Pre-HD	Post-HD	P*
Ca (mmol/l) †	1.10 ± 0.05	1.08 ± 0.03	0.33	1.12 ± 0.04	1.25 ± 0.02	<0.001
Fosfato (mg/dl) †	4.9 ± 1.4	1.8 ± 0.6	<0.001	4.0 ± 1.4	1.9 ± 0.9	<0.001
iPTH (mg/dl) †	350.9 ± 262.4	297.8 ± 225.9	0.33	269.7 ± 130.9	73.0 ± 46.0	<0.001
1,25 (OH) <sub>2</sub> D (pg/ml) †	6.10 ± 1.10	ND	-----	5.36 ± 0.9	ND	-----
25(OH)D (ng/ml) †	13.3 ± 1.79	ND	-----	8.2 ± 0.5	ND	-----
iFGF23 (pg/ml) †	613.7 ± 188.4	455.9 ± 169.6	<0.01	990.3 ± 282.4	464.6 ± 141.3	<0.001
cFGF23 (RU/ml) †	1097.0 ± 614.0	568.2 ± 500.2	<0.01	794.80 ± 483.4	395.8 ± 352.3	<0.01

**Tabla 13. Parámetros bioquímicos de metabolismo óseo mineral determinados pre-HD y post-HD en cada una de las sesiones de diálisis con diferentes concentraciones de calcio en el líquido de diálisis.** \* Test de Wilcoxon. † Media y desviación estándar.

Variable	[Ca] líquido de diálisis 2.5 mEq/l	[Ca] líquido de diálisis 3 mEq/l	P*
	Cambio Medio (%)	Cambio Medio (%)	
Ca (mmol/l) †	-1.70 ± 5.5	11.2 ± 3.3	<0.001
Fosfato (mg/dl) †	-50.0 ± 19.7	-46.4 ± 24.8	0.59
iPTH (pg/ml) †	-7.7 ± 34.6	-71.4 ± 15.2	<0.001
iFGF23 (pg/ml) †	-39.5 ± 27.1	-57.0 ± 16.8	<0.01
cFGF23 (RU/ml) †	-47.7 ± 47.9	-32.6 ± 75.4	0.89

**Tabla 14. Media de cambio de los parámetros determinados pre-HD y post-HD en cada una de las sesiones de diálisis con diferentes concentraciones de calcio en el líquido de diálisis.** \* Test de Wilcoxon. † Media y desviación estándar.



**Figura 10.** Cambio medio en las variables analizadas. Se muestran los porcentajes de cambio en cada una de las sesiones con una concentración en de calcio en el líquido de diálisis de 2.5 mEq/l y 3 mEq/l respectivamente.

#### 10.1.2.4 Análisis de correlación

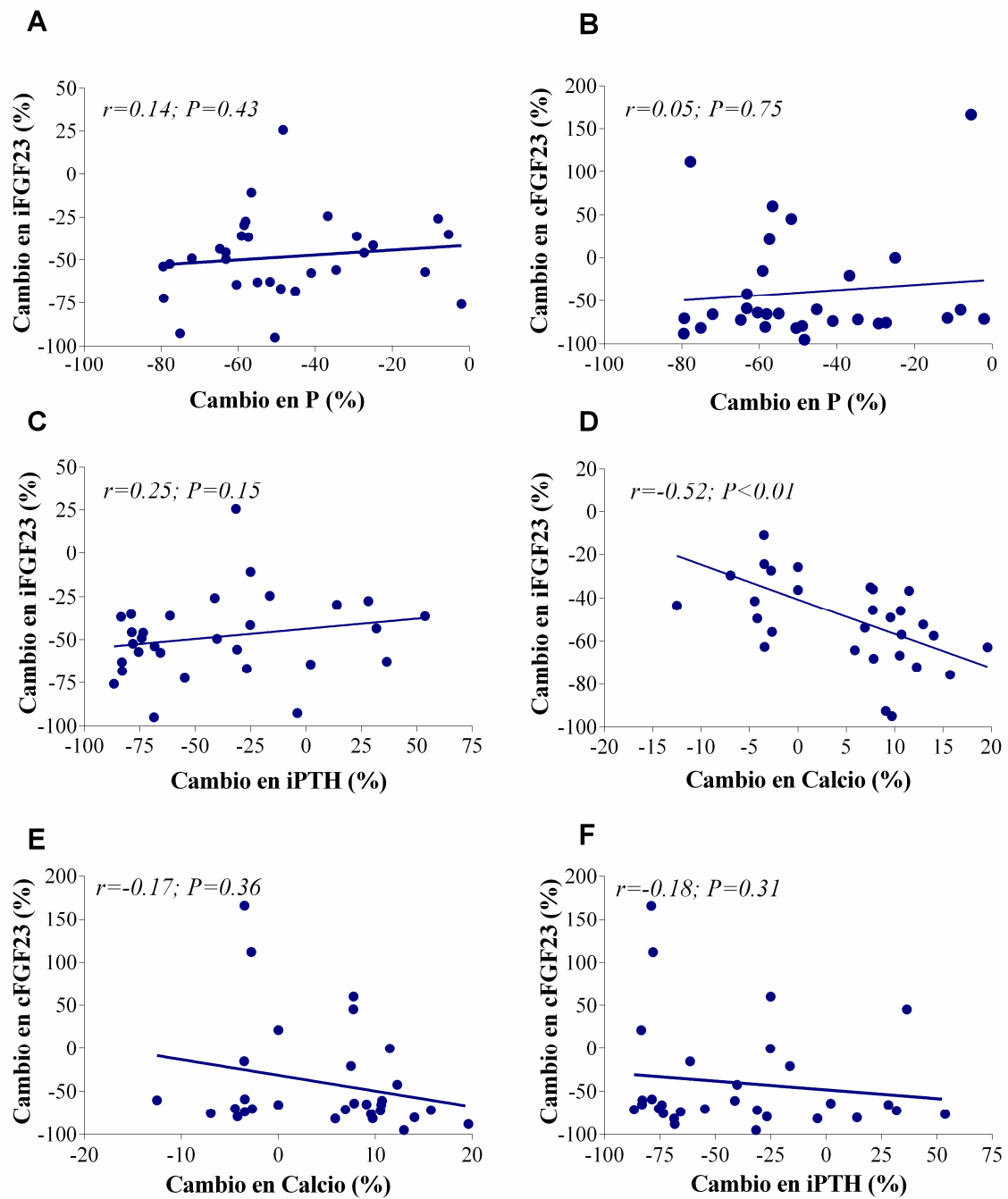
Los valores pre-HD de fosfato, calcio sérico, iPTH, calcidiol, calcitriol, ferritina, *hs*-CRP ni la ganancia de peso interdiálisis se correlacionaron con el cambio de iFGF23 ni de cFGF23. De igual forma, no observamos correlación entre el cambio agudo de fosfato, iFGF23 ( $r=0.14$ ,  $P=0.43$ ; figura 11A) y cFGF23 ( $r=0.05$ ,  $P=0.75$ ; figura 11B). Tampoco se observó correlación entre el cambio de iFGF23 y de iPTH ( $r=0.25$ ,  $P=0.15$ ; figura 11C). En relación al calcio, su cambio medio porcentual se correlacionó con el cambio de iFGF23 en la comparación global ( $r= -0.52$ ,  $P<0.01$ ; figura 11D) pero no con el de cFGF23 ( $r=0.17$ ,  $P=0.36$ ; figura 11E). Esta correlación se mantuvo cuando se analizó de forma individual el cambio de calcio tras la exposición a una concentración de calcio de 3 mEq/l e iFGF23 ( $r= -0.56$ ,  $P=0.02$ ) y rozó la significación estadística tras la exposición a una concentración de calcio en el líquido de diálisis de 2.5 mEq/l ( $r= -0.46$ ,  $P= 0.07$ ). No existió correlación entre el cambio de cFGF23 y el de iPTH (figura 11E). No observamos correlación entre el cambio de ambas moléculas de FGF23 y el Kt, el KtV, el Qb, el Qd y la ultrafiltración total por sesión.

#### 10.1.2.5 Factores asociados al descenso agudo de FGF23

Tras el análisis de correlación se procedió a realizar un análisis de regresión lineal considerando el cambio en iFGF23 y cFGF23 como variables dependientes.

En relación a iFGF23, el análisis regresión lineal univariante demostró que el cambio de calcio (*OR-no ajustado* -0.50, *IC* 95% -2.5— -0.5,  $P<0.01$ ) y los niveles pre-HD de calcitriol (*OR-no ajustado* 0.37, *IC* 95% -0.2—4.25,  $P=0.05$ ; tabla 15) determinaron el cambio de iFGF23. En el análisis multivariable, solo el cambio de calcio determino de forma independiente el descenso de iFGF23 (*OR-ajustado* -0.52, *IC* 95% -2.4— -0.5,  $P<0.01$ ; tabla 16).

Con respecto a cFGF23, en el análisis univariante, ninguna de las variables incluidas en el modelo se asoció al descenso de sus valores.



**Figura 11.** Correlación entre el cambio de iFGF23, cFGF23 y el cambio en Fósforo sérico, calcio e iPTH. La línea continua indica la recta de regresión.

Reducción iFGF23			
Variable	OR	95% CI	p
Edad (años)	0.23	-0.24—1.0	0.22
<b>Genero</b>			
Mujer	ref		
Hombre	0.30	-2.9—31.7	0.10
Tiempo efectivo sesión (Min)	0.09	-1.2—1.3	0.96
Qb (mil/min)	-0.02	-0.3—0.2	0.90
Qd (mil/min)	-0.04	-0.3—0.2	0.58
hs-CRP (mg/l)	0.11	-1.0—1.9	0.53
Cambio calcio (%)	-0.50	-2.5—0.5	<0.01
Cambio Fوسفato (%)	0.13	-0.2—0.5	0.49
Cambio iPTH (%)	0.20	-0.1—0.3	0.27
1,25 (OH) <sub>2</sub> D (pg/mL)	0.37	-0.02—4.2	0.05

Tabla 15. Regresión lineal univariante mostrando los factores asociados al descenso de iFGF23.

Reducción iFGF23			
Variable	OR-ajustado	IC 95%	P
Cambio calcio (%)	-0.52	-2.4—0.5	<0.01
Cambio Fوسفato (%)	0.08	-0.2—0.04	0.63
Cambio iPTH (%)	-0.35	-0.3—0.3	0.19
1,25 (OH) <sub>2</sub> D (pg/mL)	0.31	-1.7—2.1	0.06

Tabla 16. Regresión lineal multivariante de las variables asociadas al descenso agudo de iFGF23.



### **10.1.3 Conclusiones específicas**

- Ambas moléculas de FGF23 se reducen durante una sesión de diálisis. Sin embargo, iFGF23 parece reducirse en una mayor proporción tras la exposición a una concentración de calcio en el líquido de diálisis de 3 mEq/l. cFGF23 por su parte, se reduce en un porcentaje similar de forma independiente a la concentración de calcio utilizada en el líquido de diálisis.
- De acuerdo con nuestros resultados, los cambios agudos en los niveles de fosfato sérico no se asocian a modificaciones en FGF23.
- El cambio en los niveles de calcio sérico durante la sesión de diálisis se asocia de forma independiente al cambio (reducción) de iFGF23.

## **11. CAPITULO 4**

### **11.1 VALORAR SI LOS CAMBIOS MANTENIDOS EN LA CONCENTRACIÓN DE FOSFATO REGULAN LOS NIVELES DE FGF23 (iFGF23 y cFGF23) EN PACIENTES EN HEMODIÁLISIS.**

#### **11.1.1 Métodos**

##### **11.1.1.1 Tipo de estudio**

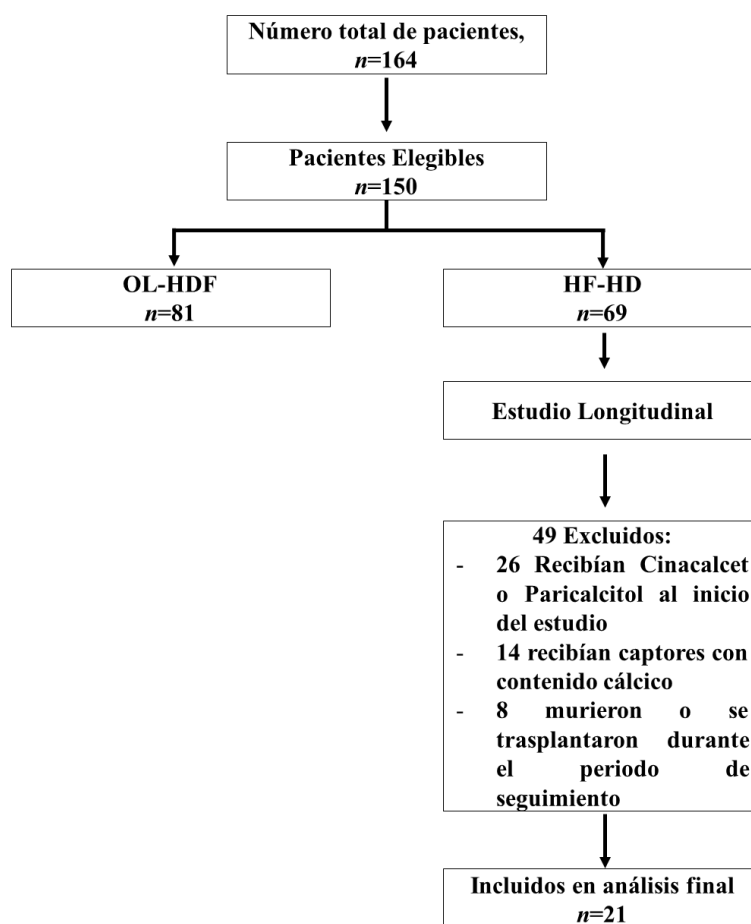
Estudio longitudinal observacional

##### **11.1.1.2 Población**

Para la consecución de este objetivo se incluyeron 21 del total de los 150 pacientes prevalentes en hemodiálisis incluidos en el estudio del primer objetivo de esta tesis doctoral. Los criterios de inclusión y exclusión se resumen a continuación. El diagrama de flujo de la figura 12 describe el procedimiento para incluir los pacientes en el estudio.

11.1.1.2.1 Criterios de inclusión: Los descritos en el apartado 7.1.1.1. La concentración de calcio en el líquido de diálisis debía ser de 3 mEq/l y no ser modificado durante el seguimiento. Ninguno de los pacientes debía recibir tratamiento con cinacalcet o paricalcitol durante el inicio del estudio ni durante su seguimiento. Los captores de fosfato utilizados debían ser sin contenido cálcico.

11.1.1.2.2 Criterios de exclusión: Los descritos en apartado de métodos generales 7.1.1.2



**Figura 12.** Diagrama de flujo que muestra el procedimiento seguido para incluir los pacientes del estudio longitudinal

### **11.1.1.3 Determinaciones sanguíneas y demográficas**

A todos los sujetos incluidos se les determinaron niveles sanguíneos de calcio iónico, calcio sérico total, fosfato, iPTH, calcidiol y calcitriol, albumina, *hs*-CRP, ferritina, IST y Hb. Se determinaron ambas isoformas de FGF23, iFGF23 y cFGF23. Todas las determinaciones siguieron las recomendaciones de los fabricantes, expuestas en el apartado de metodología general (apartado 5.2)

#### **11.1.1.4 Análisis estadístico**

El objetivo primario en el estudio longitudinal fue evaluar los cambios en las concentraciones séricas de FGF23 desde el inicio del estudio (semana 0) y la semana 40 en pacientes que alcanzaron unos niveles de fosfato sérico por debajo o por encima de 4,5 mg/dl. Al final del estudio, los pacientes que obtuvieron un fosfato sérico por debajo de 4.5 mg/dl ( $P < 4.5$  mg/dl) se compararon con aquellos con fosfato sérico  $> 4.5$  mg/dl. El objetivo de un fosfato sérico final  $< 4.5$  mg/dl se estableció de acuerdo con las recomendaciones de Sociedad Española de Nefrología<sup>16</sup> y de las KDIGO<sup>64</sup>. Se tuvieron en cuenta los niveles de fosfato medio durante las últimas 8 semanas de seguimiento para cada paciente, para establecer el grupo final de cada sujeto. Otras variables bioquímicas analizadas incluyeron modificaciones en la concentración sérica de fosfato, calcio total, calcio iónico, iPTH, *hs*-CRP, 25 (OH) D y 1,25 (OH)<sub>2</sub> D.

Los 21 pacientes finalmente incluidos en este estudio recibieron asesoramiento para evitar la ingesta de alimentos con alto contenido en fosfato, como parte de la educación nutricional de rutina que se brinda a todos nuestros pacientes en diálisis. Todos los pacientes recibieron carbonato de lantano o sevelamero para mantener el fosfato sérico por debajo de 4,5 mg/dl. El uso de uno u otro captor de fosfato dependieron de las preferencias del paciente. La dosis y la duración de los captos de fosfato fueron modificadas de acuerdo con la concentración de fosfato sérico que se determinó cada dos semanas. La dosis de diálisis se mantuvo sin cambios durante el estudio.

La prueba de correlación de Spearman se utilizó para evaluar las correlaciones entre dos variables numéricas. Las diferencias grupales para comparaciones no paramétricas numéricas se determinaron mediante los test estadísticos de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. El porcentaje de cambio de cada variable se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula: Porcentaje de cambio =  $(\text{FGF23-preHD} - \text{FGF23 post-HD}) / (\text{FGF23-pre-HD}) \times 100$ . La misma fórmula se aplicó a todas las variables analizadas.

Se utilizaron modelos mixtos lineales para comparar las diferencias longitudinales en el

fosfato sérico, calcio total, iPTH y *hs*-CRP entre los grupos a lo largo del tiempo. El iFGF23, el cFGF23, el calcio iónico en suero, la vitamina D, la ferritina y el TSAT entre la semana 0 y la semana 40 del estudio se analizaron utilizando la prueba T pareada o la prueba de rango de Wilcoxon, según correspondiera. El que los pacientes logaran o no el objetivo final de fosfato sérico (fosfato sérico final <4.5 mg/dl versus > 4.5 mg/dl) se consideró como un efecto fijo. Si el valor de “*P*” que comparó las diferencias entre curvas de cada variable en pacientes con fosfato sérico final <4.5 mg/ dl en comparación con aquellos con fosfato sérico final >4.5 mg/dl era significativo, también se analizaron las diferencias entre los grupos en cada una de las variables. También evaluamos las interacciones entre el fosfato sérico y los cambios en la *hs*-CRP (cambio de fosfato x en *hs*-PCR) en relación con los niveles séricos de FGF23.

## 11.1.2 Resultados

### 11.1.2.1 Descripción general de la población estudiada

Variable	n= 21
<b>Edad</b> (años) §	70.0 (62.0–76.5)
<b>IMC</b> (kg/cm <sup>2</sup> ) †	26.3 (23.1 – 30.2)
<b>Genero</b> (n, %)	
Masculino	12 (57.1)
Femenino	9 (42.9)
<b>Etiología ERC</b>	
Desconocida (%)	38.1
Diabetes (%)	14.3
Hipertensión (%)	4.8
Glomerulonefritis (%)	14.3
Poliquistosis (%)	9.5
Otras (%)	19.0
<b>Comorbilidades</b>	
Hipertensión (%)	71.4
Diabetes (%)	23.8
Enfermedad Coronaria (%)	23.8
Enfermedad cerebrovascular (%)	14.3
<b>Índice de Comorbilidad de Charlson</b> §	4.0 (3.0–5.0)
<b>Tipo de Acceso Vascular</b>	
AV Fistula, n (%)	11 (52.4)
Catéter, n (%)	6 (28.6)
Injerto Goretexs, n (%)	4 (19)
<b>Calcio del Líquido de diálisis 3 mEq/l</b> (n, %)	21 (100)
<b>Tiempo en Diálisis</b> (meses) §	53.7 (33.7–83.8)
<b>Duración sesión de Diálisis</b> (mins) §	245.0 (243.0–250.0)
<b>KtV</b> §	2.0 (1.8–2.4)
<b>Kt</b> (l/sesión) §	60.1 (48.8–66.65)
<b>Albumina</b> (g/L)	3.6 (3.3–3.8)
<b>Hb</b> (g/L) §	11.2 (10.4–11.9)
<b>TSAT</b> (%) §	29.0 (21.5–37.5)
<b>Ferritina</b> (ng/dl) §	529.0 (351.5–757.0)
<b>hs-CRP</b> (mg/L) §	8.0 (4.1–11.4)
<b>Ca</b> (mg/dL) §	8.9 (8.5–9.3)
<b>iCa</b> (mEq/L) §	2.2 (2.1–2.2)
<b>Fosfato</b> (mg/dl) §	4.3 (3.6–5.5)
<b>Fosfatasa Alcalina</b> (U/l) §	85.5 (74.0–108.7)
<b>iPTH</b> (pg/ml) §	284.0 (199.5–445.0)
<b>25(OH)D</b> (ng/ml) §	9.2 (8.5–18.)
<b>1,25 (OH)<sub>2</sub> D</b> (pg/ml) §	9.2 (7.7–10.3)
<b>iFGF23</b> (pg/ml) §	614.0 (346.0–958.5)
<b>cFGF23</b> (RU/ml) §	880.0 (547.5–1443.5)

Tabla 17. Características demográficas, clínicas y bioquímicas de la población incluida en el estudio longitudinal (n=21).

La mediana de edad de los sujetos era de 70 años y más de la mitad de los sujetos incluidos eran hombres. El 71% de los sujetos eran hipertensos. En general, los niveles de fosfato, calcio, iPTH, Hb, TSAT y ferritina se encontraban dentro del rango esperado para pacientes prevalentes estables en HD (Tabla 17). Después de 40 semanas de seguimiento, los 21 pacientes fueron separados en aquellos que alcanzaron el objetivo de una concentración de fosfato sérico inferior a 4,5 mg/dl, y aquellos con un fosfato sérico superior a 4,5 mg/dl. Al inicio del estudio, las características y los parámetros del metabolismo mineral de los pacientes, incluido el fosfato en suero y el FGF23 de ambos grupos, fueron similares, independientemente de si los sujetos alcanzaron o no el objetivo de niveles de fosfato (Tabla 18). La única diferencia entre los dos grupos al inicio fue la de los niveles séricos de 25 (OH) D que eran ligeramente más bajos en pacientes con fosfato sérico > 4.5 mg/dl a las 40 semanas, [10.0 ng/ml ( $9.2 \pm 19.2$ ) vs. 8.0 ng/ml ( $6.3 \pm 9.8$ );  $P=0.02$ , (Tabla 18). El índice de co-morbilidad de Charlson fue similar en ambos grupos.

Variable	Semana 0 P <4.5 mg/dL (n=12)	Semana 0 P >4.5 mg/dL (n=9)	P*
Edad (años) §	70.5 (62.5–80.5)	66.0 (56.0–73.0)	0.38
Tiempo en diálisis (meses) §	55.8 (23.9–85.6)	53.7 (34.2–98.1)	0.80
Duración sesión (min) §	245.0 (242.2–250.0)	245.0 (244.0–250.0)	0.55
Índice comorbilidad Charlson §	4.0 (3–5.0)	3.0 (2.0–5.0)	0.21
KtV §	1.94 (1.79–2.16)	2.10 (1.99–2.26)	0.11
Kt (l/sesión) §	60.5 (58.4–63.7)	63.6 (56.5–67.5)	0.27
Albumina (g/L)	3.65 (3.30–3.80)	3.50 (3.30–3.90)	0.99
Hb (g/L) §	11.5 (10.5–12.7)	11.2 (10.1–11.5)	0.19
TSAT (%) §	30.0 (21.2–40.0)	29.0 (22.0–34.5)	0.50
Ferritina (ng/ml) §	506.0 (393.0–700.0)	606.0 (312.0–833.5)	0.86
hs-CRP (mg/L) §	7.31 (3.39–11.06)	4.76 (2.78–8.83)	0.30
Ca (mg/dL) §	8.88 (8.54–9.19)	8.93 (8.40–9.46)	0.91
iCa (mEq/L) §	2.23 (2.15–2.24)	2.26 (2.16–2.31)	0.46
Fosfato (mg/dL) §	4.15 (3.50–4.90)	3.80 (3.51–5.15)	0.80
iPTH (pg/ml) §	287.3 (206.6–360.2)	236.8 (145.8–358.0)	0.86
25 (OH) D (ng/ml) §	10.0 (9.2–19.2)	8.0 (6.3–9.8)	0.02
1,25 (OH) <sub>2</sub> D (pg/ml) §	9.20 (8.42–9.63)	8.67 (7.05–15.3)	0.86
iFGF23 (pg/ml) §	581.0 (491.2–886.0)	709.0 (179.0–1247.5)	0.42
cFGF23 (RU/ml) §	1034.0 (432.2–1368.7)	880.0 (610.5–2070.5)	0.65

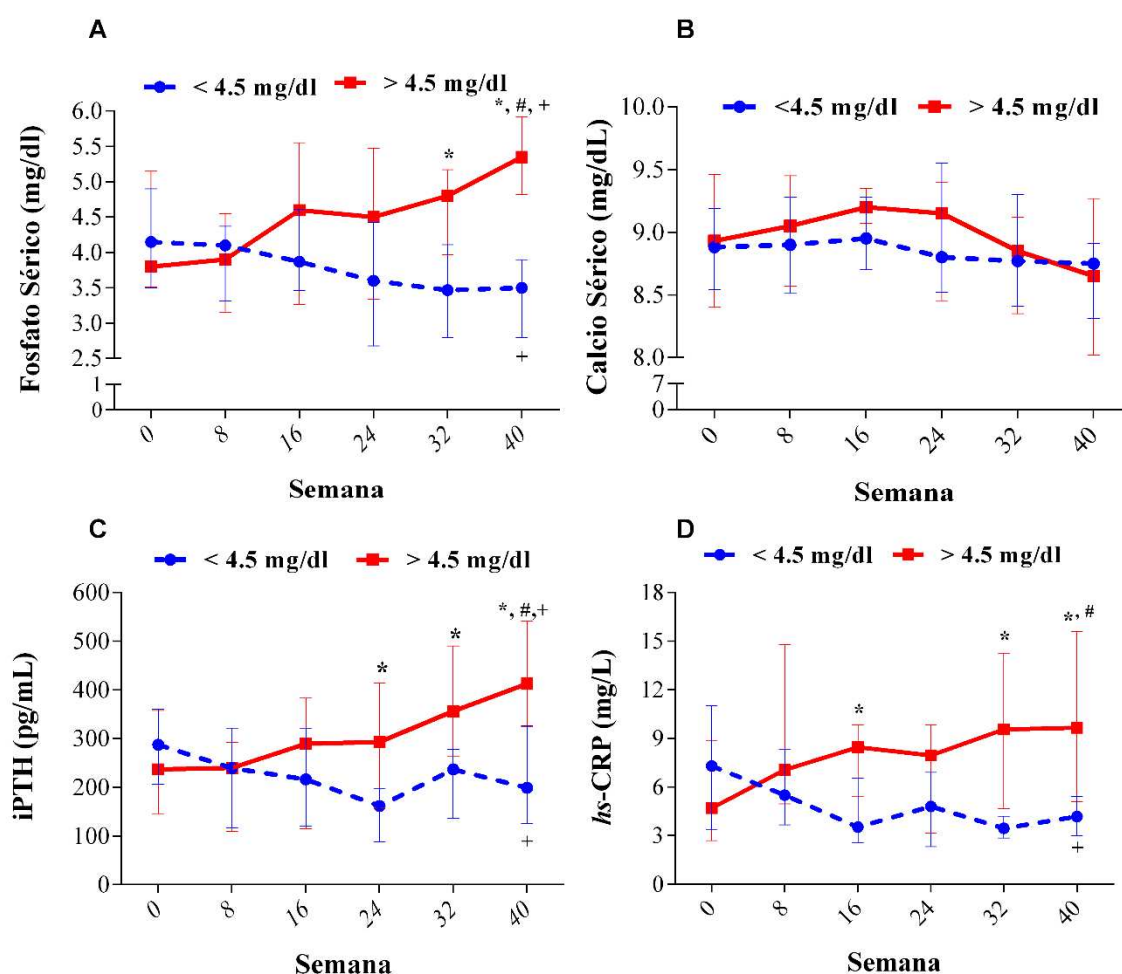
**Tabla 18. Características clínicas y bioquímicas basales de los pacientes incluidos en el estudio longitudinal (40 semanas) (n = 21). Los pacientes se dividieron según el fosfato sérico final, por debajo o por encima de 4.5 mg/dl.** Todos los pacientes fueron expuestos a un dializado que contenía 3 mEq/l de calcio y recibieron HF-HD durante el seguimiento. Los datos se expresan como mediana y rango intercuartílico. Test de Mann-Whitney.

#### 11.1.2.2 Modificaciones en fosfato, sérico, calcio, PTH y hs-CRP

Las trayectorias longitudinales de fosfato sérico, calcio total, iPTH y hs-CRP, se pueden apreciar en la figura 13. Por definición, los niveles séricos de fosfato fueron significativamente más altos en pacientes con un fosfato sérico final  $>4,5$  mg/dl en comparación con aquellos que sí lograron el objetivo ( $P < 0.001$  para la comparación global) (Figura 13A). Las diferencias entre los grupos se alcanzaron a partir de la semana 32 ( $P < 0.05$ ). El cambio en el fosfato sérico se asoció con un cambio significativo y concomitante en la iPTH a pesar de la ausencia de cambios en el calcio sérico total ( $P < 0.01$  para la comparación global) (Figura 13B y 13C). La hs-CRP también aumentó progresivamente en pacientes con fosfato sérico final  $> 4.5$  mg/dl ( $P < 0.01$  para la comparación global; figura 13D). Los cambios de los diferentes parámetros en pacientes dentro del mismo grupo mostraron resultados similares a los obtenidos por comparaciones globales. En los pacientes que alcanzaron el objetivo, el fosfato sérico ( $P < 0.01$ ), la iPTH ( $P = 0.04$ ) y la hs-CRP ( $P < 0.001$ ) disminuyeron significativamente (Fig. 13A y 13D). Por el contrario, en el grupo de pacientes que no logró el objetivo, el fosfato sérico y la PTH mostraron un aumento significativo ( $P < 0,001$  para ambos parámetros). Los valores de hs-CRP presentaban una tendencia creciente que no alcanzó la significación estadística ( $P = 0.16$ ). Sin embargo, en la semana 40, los niveles de hs-CRP fueron significativamente más altos en los pacientes que no lograron el objetivo que en aquellos con fosfato sérico final  $< 4.5$  mg/dl ( $P = 0.02$ ). Las diferencias entre los grupos al final del estudio también fueron estadísticamente significativas para la iPTH ( $P < 0.01$ ) (Fig. 13C y tabla 19). El calcio sérico total y la concentración de calcio iónico en suero no cambiaron en ambos grupos (Fig. 13B y tabla 19). No se observaron cambios desde el inicio hasta el final del estudio en lo que se refiere a la duración de la diálisis, KtV, Kt, albúmina, hemoglobina, TSAT, ferritina sérica, 25 (OH) D o 1,25 (OH) 2 D (Tabla 19). La interacción entre el cambio de fosfato y la hs-CRP (Cambio en fosfato X hs-CRP) fue



estadísticamente significativo ( $P$  para la interacción = 0.03).

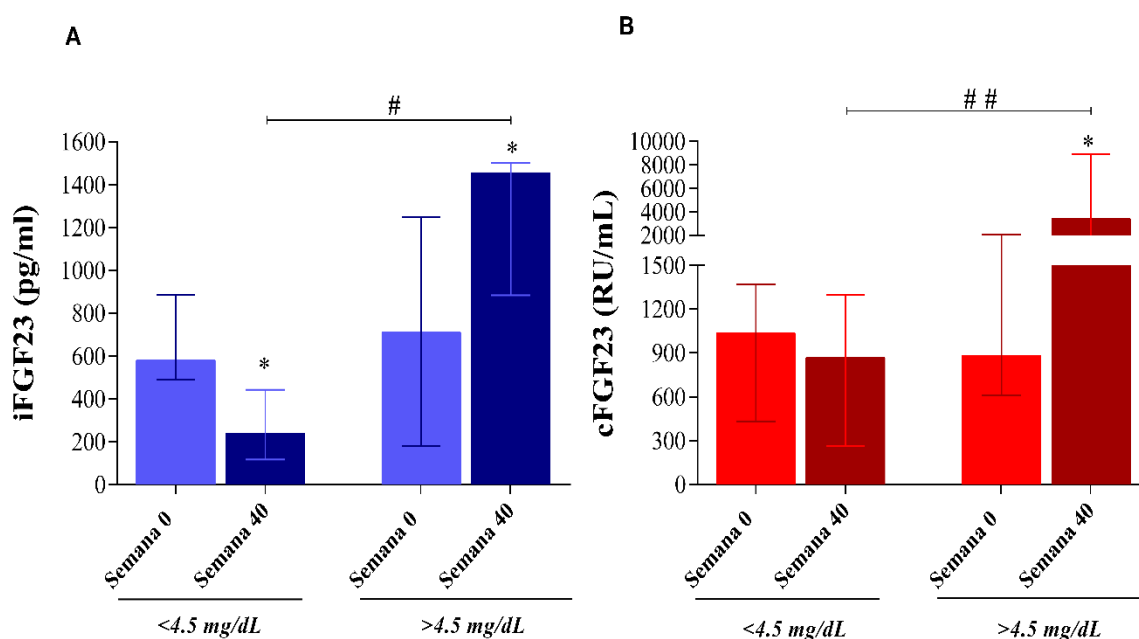


**Figura 13.** Cambio en los parámetros del metabolismo mineral a lo largo de las 40 semanas de seguimiento en pacientes que completaron el estudio con una concentración de fosfato sérico por encima o por debajo de 4,5 mg/dL. En el grupo de pacientes con fosfato final <4,5 mg/dl, el 54, 80, 80, 80, 100 y 100% de los sujetos presentaban un fosfato sérico en rango inferior al objetivo en la semana 0, 8, 16, 24, 32 y 40 respectivamente. Por el contrario, en el grupo con un fosfato sérico final >4,5 mg/dl, 66, 77, 44, 44, 33 y el 0% de los pacientes tenían niveles de fosfato sérico por debajo del objetivo del estudio a lo largo del período de estudio. Los puntos representan la mediana y las líneas representan IQR. \* Diferencias entre grupos  $P < 0,05$ . + Diferencias intragrupo  $P < 0,05$  para los diferentes grupos. #  $P < 0,001$  para la comparación global de curvas.

### 11.1.2.3 Cambios en FGF23

El cambio en las concentraciones séricas de iFGF23 y cFGF23 desde el inicio hasta el final del estudio se pueden observar en la figura 14. En pacientes con control sostenido del fosfato sérico, la concentración sérica de iFGF23 disminuyó desde 581.0 pg/ml (491.2—886.0) hasta 238.5 pg/ml (IQR 116.7—443.5),  $P = 0.03$ ; con una mediana de

disminución porcentual del 63.8% (IQR -75.2—5.40). Por el contrario, en pacientes con fosfato sérico >4.5 mg/dl, la concentración de iFGF23 aumentó desde 709.0 pg/ml (179.0—1247.5) hasta 1445.0 pg/mL (IQR 884.0—500),  $P = 0.03$ . [variación mediana porcentual del 65,3% (IQR 9.1—368.1); tabla 19; figura 14A]. cFGF23 no disminuyó en pacientes con fosfato sérico <4,5 mg/dl, pero sí aumentó más del doble en pacientes con fosfato >4,5 mg/dl (Tabla 19; figura 14B).



**Figura 14. Concentraciones séricas de FGF23 al inicio del estudio y en la semana 40 en pacientes que alcanzaron una concentración de fosfato sérico de <4.5 mg/dl y >4.5 mg/dl). (A) Cambio en la concentración de iFGF23; (B) cambio en la concentración sérica de cFGF23. Las barras representan la mediana y el rango intercuartílico. iFGF23 disminuyó desde 581.0 pg/ml (491.2—886.0) hasta 238.5 pg/ml (116.7—443.5) [cambio porcentual promedio de 63.8% (-75.2—5.40) en pacientes que alcanzaron el objetivo de fosfato <4.5 mg/dl. En pacientes con fosfato sérico >4.5 mg/dl, iFGF23 aumentó desde 709.0 pg/ml (179.0—1247.5) hasta 1445.0 pg/ml (884.0 ± 1500), [variación porcentual de 65.3% (9.1—368.1). cFGF23 no disminuyó en aquellos pacientes que lograron el objetivo en los niveles de fosfato sérico [cambio porcentual medio -36.3 (-60.1—48.3). Sin embargo, en pacientes con un fosfato sérico final >4,5 mg/dl, aumentó desde 864.5 RU/ml (262.7—1299) hasta 3402.0 RU/ml (1899.0—8875), [mediana de porcentaje de cambio del 206.9% (108.9—1056.3)]. \*  $P < 0.05$  vs línea de base. #  $P < 0.05$  contra el mismo grupo en diferente tiempo. ##  $P < 0.001$  versus grupo diferente en el mismo tiempo.**

Variable	Semana 40 P <4.5 mg/dL n=12	Semana 40 P >4.5 mg/dL n=9	P*
<b>Tiempo en diálisis</b> (meses) §	245.0 (243.0–247.5)	246.0 (243.5–249.5)	0.50
<b>KtV</b> §	1.94 (1.76–2.08)	2.14 (1.86–2.34)	0.27
<b>Kt</b> (l/sesión) §	61.4 (48.7–63.9)	64.0 (53.5–67.5)	0.24
<b>Albumina</b> (g/L)	3.65 (3.37–3.80)	3.50 (3.35–3.95)	0.88
<b>Hb</b> (g/L) §	11.9 (11.2–13.4)	11.4 (10.7–12.0)	0.19
<b>TSAT</b> (%) §	29.0 (23.7–46.0)	25.0 (21.5–31.5)	0.19
<b>Ferritina</b> (ng/ml) §	500.5 (268.7–827.0)	365.0 (173.5–655.5)	0.27
<b>hs-CRP</b> (mg/L) §	4.17 (3.01–5.41)	9.65 (5.20–15.6)	0.02
<b>Ca</b> (mg/dL) §	8.75 (8.31–8.91)	8.65 (8.02–9.27)	0.91
<b>iCa</b> (mEq/L) §	2.23 (2.20–2.25)	2.20 (2.05–2.32)	0.91
<b>Fosfato</b> (mg/dL) §	3.50 (2.78–3.95)	5.35 (4.82–5.92)	<0.001
<b>iPTH</b> (pg/ml) §	199.0 (125.1–326.4)	412.5 (325.0–541.2)	<0.01
<b>25 (OH) D</b> (ng/ml) §	11.8 (8.10–14.8)	8.29 (6.96–10.8)	0.09
<b>1,25 (OH)<sub>2</sub> D</b> (pg/ml) §	7.80 (7.20–8.87)	12.9 (5.26–14.4)	0.31
<b>iFGF23</b> (pg/ml) §	238.5 (131.7–443.5)	1455.0 (884.0–1500.0)	<0.01
<b>cFGF23</b> (RU/ml) §	864.5 (262.7–1299.5)	3402.0 (1899.0–8875.0)	<0.001

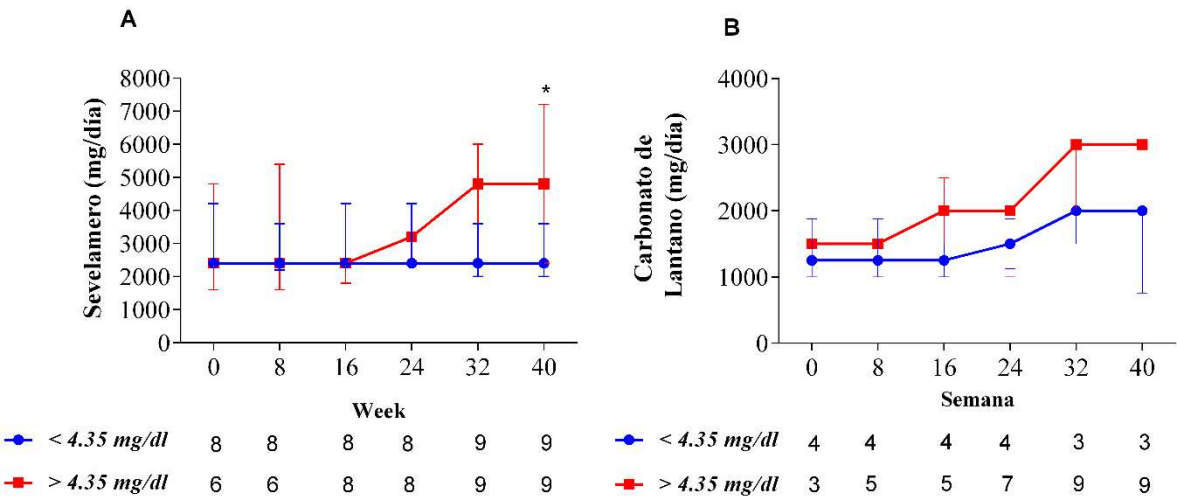
**Tabla 19. Efecto del control a largo plazo del fosfato sérico (40 semanas) sobre los valores de FGF23 y el resto de variables (Fosfato sérico <4.5 contra >4.5 mg/dl).**

La preparación de hierro IV utilizada en nuestro estudio fue el hierro sacarosa y se prescribió a cinco de los 12 pacientes que alcanzaron un fosfato sérico <4,5 mg/dl y a 4 de los 9 que terminaron con fosfato sérico >4,5 mg/dl. La dosis de hierro IV fue comparable en ambos grupos. No hubo correlación entre el nivel basal de ferritina y el cambio en iFGF23 ( $r=-0.18$ ,  $P=0.42$ ) o cFGF23 ( $r=0.11$ ,  $P=0.62$ ). No se encontró correlación entre el TSAT al inicio del estudio y el cambio en iFGF23 ( $r=-0.29$ ,  $P=0.18$ ) o en cFGF23 ( $r=-0.18$ ,  $P=0.41$ ). Estos hallazgos persistieron tras analizar ambos grupos individualmente. Tampoco se encontró asociación entre el tratamiento con EPO y los cambios en iFGF23 o cFGF23.

Con respecto al uso de captadores de fosfato, el 66.7% ( $n=14$ ) de los pacientes recibían carbonato de lantano al inicio del estudio y el 33.3% ( $n=7$ ) sevelamero. Al final del estudio, todos los pacientes del grupo con fosfato final >4.5 mg/dl recibían ambos

captore. Las dosis prescritas de captore de fosfato durante el estudio se muestran en la figura 15. Como era de esperar, a los pacientes con un peor control de fosfato a lo largo del estudio se les prescribieron dosis más altas de captore de fosfato. El carbonato de lantano se suspendió en un paciente debido a una reducción excesiva en el fosfato sérico.

Un análisis adicional, utilizando las mediciones de todos los pacientes, reveló que el cambio porcentual en la concentración de fosfato sérico era proporcional al cambio porcentual en las moléculas iFGF23 y cFGF23 (Tabla 20). El porcentaje de cambio en el fosfato sérico también se correlacionó con el cambio en iPTH y *hs*-CRP, que a su vez también se correlacionó con cambios en ambas moléculas de FGF23 (Tabla 20).



**Figura 15. Dosis de Carbonato de sevelamer y carbonato de lantato prescritas en pacientes los pacientes incluidos en el estudio longitudinal (fosfato sérico final <4.5 mg/dl contra >4.5 mg/dl).** Las dosis fueron modificadas de acuerdo con los cambios en los niveles de fosfato y la preferencia del paciente. Los puntos representan la mediana y los líneas percentiles 25 y 75. El número de pacientes bajo cada tratamiento en cada momento de tiempo evaluado se representa bajo el eje x. Después de la 8ª semana, aumentó el número de pacientes que requirieron ambos captore simultáneamente. \* Diferencias entre grupos  $P < 0.05$ .

Variable	iFGF23		cFGF23		Fosfato		iPTH	
	<i>r</i> <sup>#</sup>	<i>P</i> <sup>*</sup>	<i>r</i> <sup>#</sup>	<i>P</i> <sup>*</sup>	<i>r</i> <sup>#</sup>	<i>P</i> <sup>*</sup>	<i>r</i> <sup>#</sup>	<i>P</i> <sup>*</sup>
<b>cFGF23</b> (RU/mL) <sup>b</sup>	0.51	0.01	-	-	-	-	-	-
<b>Fosfato</b> (mg/dL) <sup>c</sup>	0.78	<0.001	0.51	0.01	-	-	-	-
<b>iPTH</b> (pg/mL) <sup>d</sup>	0.47	0.02	0.43	0.04	0.63	<0.01	-	-
<b>hs-CRP</b> (mg/L) <sup>e</sup>	0.49	0.02	0.61	<0.01	0.62	<0.01	0.63	<0.01

**Tabla 20. Correlaciones lineales simples entre el porcentaje de cambio en la concentración de fosfato sérico, ambas moléculas de FGF23, de iPTH y hs-CRP (como índice de inflamación) en pacientes después de 40 semanas de tratamiento.** <sup>#</sup> \* Coeficiente de correlación de Spearman.

### **11.1.3 Conclusiones Específicas**

- Los cambios a mediano plazo en el fosfato sérico se asocian a modificaciones en FGF23. El incremento o descenso de fosfato favorece cambios paralelos en los niveles circulantes de FGF23.
- El incremento o la reducción en los niveles de fosfato sérico se asocia a cambios en los niveles de iPTH.
- Existe una estrecha relación entre los niveles de fosfato sérico y marcadores de inflamación como la *hs*-CRP. Al igual que con FGF23, los cambios en los niveles de fosfato sérico, se asocian a cambios directamente proporcionales en *hs*-CRP.
- La reducción en los niveles de fosfato sérico parece jugar un papel fundamental para conseguir reducir los niveles de *hs*-CRP y de FGF23.

# ***DISCUSIÓN***

## **12. DISCUSIÓN**

Los objetivos de esta tesis doctoral incluyeron el estudio de los factores asociados con el incremento de FGF23 en pacientes en hemodiálisis, el efecto de la diálisis sobre los valores circulantes de FGF23 y los factores asociados a su cambio agudo y finalmente el efecto del control a largo plazo del fosfato sérico en los niveles de FGF23. La discusión de cada uno de los objetivos se desarrollará de forma independiente a continuación.

### **12.1 Analizar los factores relacionados con la regulación de ambas isoformas de FGF23 (intacta y c-terminal) en pacientes en hemodiálisis.**

De forma general, las funciones biológicas de FGF23 se le atribuyen a la isoforma intacta (iFGF23). Algunos estudios han sugerido de que a pesar de que cFGF23 conserva su habilidad para unirse al complejo FGFR1/*Klotho*, no tiene capacidad para inducir la activación de este receptor actuando como antagonista competitivo <sup>320</sup>. Sin embargo, otros autores han sugerido que algunos fragmentos de cFGF23 conservan funciones fosfatúricas si bien no se ha logrado demostrar que conserven los efectos deletéreos en otros órganos <sup>33,321</sup>. Es probable que estos efectos se vean limitados por la corta vida media de los fragmentos c-terminal <sup>320</sup>.

La determinación simultánea de ambas moléculas, puede permitir de forma indirecta medir no solo la fracción de FGF23 circulante, que corresponde a la isoforma intacta y de los factores asociados a su incremento, sino también de los fragmentos cFGF23 y por tanto de las variables que promueven la proteólisis de FGF23 <sup>31</sup>. En este sentido, nuestro estudio es uno de los pocos que ha determinado ambas isoformas circulantes de FGF23 en una cohorte importante de pacientes en hemodiálisis. Algunos artículos han sugerido una equivalencia entre los niveles circulantes de iFGF23 y cFGF23 <sup>167,322</sup> ocasionando una proliferación de estudios en los que se han determinado de forma exclusiva



fragmentos c-terminal <sup>251,323,324</sup>. Más recientemente, otros autores han sugerido que la estabilidad de iFGF23 en el plasma de pacientes con ERC es menor en comparación con los fragmentos de cFGF23, ocasionando una baja correlación entre sus niveles circulantes, que podría estar explicado por variaciones en la actividad de proteasas endógenas o inhibidores de la proteólisis de FGF23 <sup>325</sup>. De hecho, el uso de inhibidores de la proteólisis de FGF23 inmediatamente extraídas las muestras de plasma no ha logrado mejorar la correlación entre las moléculas, lo que sugeriría que los resultados obtenidos tras la medición de una molécula u otra no son sean intercambiables <sup>325,326</sup>. Consecuentemente, bajo la premisa de que la correlación y concordancia entre los niveles circulantes de iFGF23 y cFGF23 no es absoluta, las variables independientes que se asocian al incremento de cada una de las moléculas de FGF23 no son totalmente equiparables y por tanto su regulación es diferente <sup>327</sup>. De hecho, nuestro análisis reveló que, aunque las moléculas de iFGF23 y cFGF23 se correlacionaron entre sí, las variables asociadas al incremento de una u otra moléculas no son completamente equiparables, por tanto, la translación de resultados obtenidos con la medición de una molécula o de la otra en pacientes en HD podría inducir errores de interpretación en la práctica clínica diaria.

También examinamos las variables asociadas con los altos niveles circulantes de iFGF23 y cFGF23 en pacientes con HD. El análisis transversal de nuestra población (n = 150) de pacientes en hemodiálisis confirmó un efecto robusto de las concentraciones de fosfato sérico en los niveles de FGF23. De forma clásica, el fosfato sérico o la carga de fosfato se han asociado al incremento de los niveles de FGF23 <sup>40,231,235,271</sup>. En estadios precoces de la ERC esta asociación es menos evidente, debido a que los niveles séricos de fosfato se mantienen dentro del rango de la normalidad gracias a la acción fosfatúricas de la PTH y de FGF23 <sup>106</sup>. Sin embargo, la progresión de la ERC, acompañada casi ineludiblemente de un incremento en la carga de fosfato y en la mayoría de casos de hiperfosfatemia, que ocasiona una pérdida de este mecanismo contrarregulador y consecuentemente un incremento en los niveles de FGF23 y PTH <sup>9</sup>. De hecho, en nuestro estudio no solo encontramos una correlación positiva entre los niveles de fosfato y ambas moléculas de FGF23, sino también que los pacientes con niveles de fosfato sérico por encima de 5 mg/dl (3er tercil) duplicaban los valores tanto de iFGF23 como de cFGF23 en comparación a aquellos pertenecientes a los terciles más bajos de fosfato. Estos resultados

se acentuaban, cuando estas comparaciones se realizaron de acuerdo a los niveles medianos de fosfato sérico. En este sentido, se observó que los sujetos con fosfato sérico por encima de la mediana presentaban niveles de iFGF23 y cFGF23, que triplicaban los de aquellos sujetos con valores de fosfato  $<4.35$  mg/dl. Los resultados del análisis bivariante fueron corroborados tras la realización de la regresión lineal, que demostró que, de forma general, los niveles de fosfato sérico, el calcio iónico sérico y los niveles de *hs*-CRP determinaban de forma independiente los niveles de iFGF23. Nuestro estudio, es el primer análisis, que en una población de pacientes en HD ha logrado demostrar y cuantificar la contribución proporcional del fosfato sérico sobre los niveles circulantes de iFGF23. Los niveles de fosfato contribuyeron en 66% a los niveles circulantes de iFGF23 en la población total. A pesar de que cuando se categorizo la población de acuerdo a los niveles medianos de fosfato, la contribución del fosfato descendió levemente en cada uno de las subpoblaciones con respecto a la población general, el fosfato sérico continuó siendo la variable más relevante. Por tanto, es una variable a considerar al diseñar maniobras terapéuticas dirigidas al descenso de FGF23. En relación a cFGF23, el fosfato sérico también determino de forma independiente sus valores, aunque con un coeficiente de determinación levemente inferior y contribuyendo en aproximadamente el 40% de sus niveles circulantes en la población general.

Otra de los factores con gran relevancia en pacientes en hemodiálisis es el calcio sérico dada su asociación con una alta tasa de morbilidad y mortalidad en esta población de alto riesgo <sup>51,149,306,328,329</sup>. Debido a que el hueso responde de forma precisa a diferentes estímulos, que conllevan a la liberación de calcio desde sus depósitos, la existencia de vías de señalización que asociaran la producción de FGF23 con el calcio era un evento esperable. En esta línea, estudios en animales han demostrado que ratas sometidas a dietas bajas en calcio y vitamina D y que desarrollaron hipocalcemia, presentaban niveles circulantes bajos de FGF23, independientemente de los niveles de PTH. Además, la adición de una dieta rica en fosfato, que se acompañó de un incremento en los niveles de PTH, no se asoció al incremento de FGF23 en aquellas ratas en las que la hipocalcemia persistía <sup>43</sup>. Una vez restablecidos los niveles de calcio mediante la inyección intraperitoneal de calcio, los niveles de FGF23 se incrementaron. El efecto de la

hipocalcemia sobre los niveles circulantes de FGF23, sugiere una respuesta fisiológica esperable, debido a que el incremento en los niveles de FGF23 a pesar de la hipocalcemia, conllevaría a una mayor reducción recíproca de los niveles de calcitriol que empeorarían la hipocalcemia <sup>43</sup>. Este estudio también sugiere la existencia de un umbral, a partir del cual los niveles de calcio inhiben o favorecen la producción de FGF23, que se localiza alrededor de los 4 mg/dl de calcio iónico. Otro estudio, demostró que el efecto del calcio sobre FGF23 también está influenciado por los niveles de fosfato sérico, debido a que, si los niveles de fosfato se encuentran por encima de 5 mg/dl, el calcio sérico pierde su habilidad para favorecer la producción de FGF23. De igual forma, el descenso en los niveles de calcio por debajo de 8 mg/dl, se tradujo en una pérdida en la secreción de FGF23 mediada por los niveles de fosfato sérico <sup>243</sup>. En esta línea, nuestro estudio demuestra y confirma la existencia de este umbral también en pacientes en HD. Los resultados de la regresión lineal, sobre la totalidad de la población demuestran un efecto independiente de los niveles de calcio iónico sérico sobre los niveles circulantes elevados de iFGF23. Por otra parte, los resultados con mayor relevancia fueron los obtenidos tras realizar los modelos de regresión en la población estratificada de acuerdo a los niveles de fosfato sérico. En sujetos con fosfato sérico <4.35 mg/dl, la contribución proporcional del calcio iónico sérico sobre iFGF23 fue cercana al 25%, mientras que solo fue del 2% en los sujetos con de fosfato sérico >4.35 mg/dl. Adicionalmente, de forma notoria, el calcio iónico sérico no tuvo ninguna influencia sobre los valores de cFGF23, lo que explicaría la falta de asociación entre el calcio y FGF23 en otros estudios. Por lo tanto, en pacientes con fosfato sérico controlado, el calcio sérico alto inhibe la reducción de iFGF23. Recientemente, resultados provenientes de un análisis *post hoc* del estudio *EVOLVE*, han demostrado que el calcio sérico no solo se asocia a la inhibición o estimulación en la secreción de iFGF23, sino que también es capaz de modular el efecto de la estimulación del CaSR sobre el descenso de PTH mediado por calcimiméticos. El estudio *EVOLVE* fue diseñado para demostrar si el descenso de PTH mediado por calcimiméticos reducía la mortalidad de origen cardiovascular en pacientes en hemodiálisis <sup>139</sup>. Aunque el estudio inicial no logro demostrar un beneficio del descenso de PTH mediado por calcimiméticos sobre la mortalidad por todas las causas y en particular de origen cardiovascular, este análisis *post hoc* han logrado demostrar que el descenso de FGF23 mediado por

calcimiméticos no solo se asocia a una reducción del riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular sino también por presentar ECV, ICC y muerte súbita <sup>44</sup>. Este efecto favorable de los calcimiméticos sobre la mortalidad de origen cardiovascular estaba determinado por el porcentaje de reducción de FGF23. Los sujetos en quienes se logró un descenso superior al 30% tras 20 semanas de tratamiento, fueron quienes se beneficiaron del efecto protector de los calcimiméticos. Los sujetos que no alcanzaron un descenso superior al 30% en los niveles de iFGF23, presentaban niveles de calcio sérico por encima del límite superior recomendado por las guías KDOQI. Lo anterior demuestra que los niveles elevados de calcio sérico modulan la reducción de FGF23 mediada por el uso de calcimiméticos. Consecuentemente, no es sorprendente que los calcimiméticos se asocien a una reducción de la mortalidad de origen cardiovascular no aterosclerótica, dada su capacidad no solo de reducir la PTH, sino también los niveles de calcio, fosfato y de FGF23 <sup>44</sup>. Por tanto, nuestros resultados confirman resultados obtenidos en animales que confirman una interacción entre los niveles de fosfato y calcio séricos en la producción de FGF23 de tal forma que, tras el control del fosfato sérico, se debe evitar el incremento en los niveles de calcio sérico para el control de FGF23.

Varios estudios han demostrado el efecto directo que tiene la PTH en la producción y secreción de FGF23 <sup>28,46,47</sup>. En condiciones fisiológicas, existen vías de señalización bidireccionales entre la producción de PTH y FGF23. En pacientes con ERC, tanto la PTH como FGF23, se encuentran simultáneamente elevados debido a un incremento en la resistencia ósea a la PTH y a la reducción del complejo FGFR1/*Klotho* a nivel paratiroideo <sup>82</sup>. Estudios *in vivo e in vitro*, han demostrado que la PTH incrementa la expresión de genes responsables de la producción de FGF23 y que este efecto se revierte tras la paratiroidectomía <sup>28</sup>. Estos datos sugieren que el descenso de FGF23 en pacientes con ERC está directamente relacionado con el control del HPTS. De hecho, la reducción de FGF23 mediante el uso de calcimiméticos se asocia no solo al descenso de FGF23 sino también de eventos cardiovasculares <sup>44</sup>. Recientemente, se ha demostrado que la PTH promueve la transcripción de FGF23 mediante la estimulación del factor nuclear huérfano 1 (Nurr1), un receptor relacionado con la producción de osteopontina y osteocalcina <sup>45,330</sup>. La PTH promueve la sobreexpresión de Nurr1, que precede la transcripción de FGF23

mediada por PTH<sup>45</sup>. En pacientes con ERC que reciben hemodiálisis, diversos estudios han demostrado una correlación entre los niveles de FGF23 y PTH<sup>235,271</sup>. En esta línea, nuestro estudio en pacientes prevalentes en hemodiálisis confirma estos resultados ya que ambas isoformas de FGF23 mostraron una correlación positiva con los niveles de PTH. Sin embargo, la inclusión de los niveles de PTH en los modelos de regresión lineal, no evidenció un efecto independiente de los niveles de PTH sobre el incremento de FGF23. El efecto predominante de los niveles de fósforo y calcio séricos sobre el incremento de FGF23 podría superar el efecto de la PTH sobre el aumento de FGF23 en pacientes en HD. De hecho, la influencia de los niveles de PTH sobre ambas moléculas de FGF23 no alcanza el 4%.

Estudios recientes también han demostrado que existe una relación entre la inflamación y FGF23<sup>48,251,331</sup>. De hecho, mediante la activación del FGFR4 en hepatocitos, FGF23 promueve la producción de citoquinas inflamatorias en modelos animales de ERC<sup>55</sup>. Además, la carga de fósforo oral induce un aumento del TNF $\alpha$  en suero y de IL-6<sup>141,237</sup>, un efecto que se revirtió con la utilización de captadores de fósforo, que promovieron la reducción de la hiperfosfatemia<sup>248</sup>. Por lo tanto, es importante caracterizar esta interrelación, ya que los tres componentes, fósforo, inflamación y FGF23 parecen estar asociados, de forma independiente, con la mortalidad y la enfermedad cardiovascular en pacientes en HD<sup>49</sup>. En esta línea, nuestros datos muestran que los niveles elevados de fósforo sérico se asocian de forma directa con los de *hs*-CRP. Sin embargo, faltan estudios prospectivos diseñados para analizar el efecto del control del fósforo sérico sobre la inflamación en la población en HD. En nuestro estudio, la *hs*-CRP se correlacionó con cFGF23 y también, aunque en menor medida, con los niveles de iFGF23. De hecho, la influencia de la *hs*-CRP sobre los niveles de cFGF23, de acuerdo con el análisis de *RWs* fue casi 3 veces mayor que la de *hs*-CRP sobre iFGF23. Además, los pacientes clasificados en los subgrupos de alto fósforo/ alto iFGF23 y alto fósforo / alto cFGF23 mostraron los niveles séricos más altos de *hs*-CRP, lo que sugiere que la inflamación está asociada con el aumento de ambas moléculas de FGF23. En contraposición, aquellos grupos con bajo fósforo / bajo iFGF23 y bajo fósforo /bajo cFGF23 mostraron los niveles más bajos de *hs*-CRP. En pacientes con fósforo sérico dentro del rango normal (<4,35 mg/dl), cFGF23 estuvo mucho más influenciado por la *hs*-CRP, mientras que iFGF23 fue

más dependiente del calcio iónico en suero que la *hs*-CRP. Además, hemos observado como otros autores <sup>332</sup>, que el tiempo de permanencia en diálisis se asoció de forma independiente con un mayor cFGF23, lo que podría estar asociado a una mayor prevalencia del proceso inflamatorio con tiempos prolongados de permanencia en diálisis.

Otro mecanismo mediante el cual el proceso inflamatorio se asocia al incremento de FGF23 es mediante la desregulación del metabolismo del hierro <sup>254</sup>. Dada la alta prevalencia de deficiencia real o funcional de hierro en pacientes con ERC, esta asociación ha ganado relevancia. Las alteraciones en el metabolismo del hierro están estrechamente relacionadas con la presencia de inflamación. Sin embargo, en este contexto, se debe diferenciar el efecto del proceso inflamatorio agudo y crónico sobre la producción de FGF23. Por un lado, el proceso inflamatorio agudo favorece la transcripción de FGF23 a nivel óseo, aunque sus niveles circulantes se mantienen dentro de los límites normales debido a un incremento de la proteólisis de la molécula intacta y por tanto un incremento de los fragmentos de cFGF23. Por el contrario, la inflamación crónica incrementa ambas moléculas, aunque los fragmentos de cFGF23 se elevan en una mayor proporción comparados con iFGF23 <sup>48</sup>. Este efecto diferencial del proceso inflamatorio agudo o crónico, sobre la producción y secreción de FGF23, podría estar relacionado con la acción de la inflamación sobre las enzimas de proteólisis, que podrían ver sobrepasada su capacidad de fragmentar la molécula intacta cuando el proceso inflamatorio se cronifica <sup>48</sup>. Los pacientes evaluados en nuestro estudio presentaban niveles de ferritina, Hb, y TSAT dentro de los límites actualmente recomendados. Esto podría explicar la falta de asociación entre los niveles de ferritina, transferrina y TSAT con FGF23 en nuestro estudio. Adicionalmente, los niveles de cFGF23 fueron superiores a los de iFGF23 en esta cohorte de pacientes. En este sentido, el proceso inflamatorio es altamente prevalente en pacientes con ERC y en particular en aquellos que reciben hemodiálisis <sup>143,151,333</sup>. Consecuentemente, aunque se ha sugerido que la escisión proteolítica de FGF23 se encuentra disminuida en la inflamación crónica, la mayor proporción de cFGF23 podría ser explicado por el tiempo de permanencia en diálisis. Teniendo en cuenta, que la inflamación crónica favorece un estado de déficit funcional de hierro, podría simular el efecto del déficit real de hierro sobre FGF23, que se caracteriza por un incremento predominante de cFGF23 <sup>254</sup>. Finalmente, es posible que la

uremia *per se* favorezca la acción de enzimas de proteólisis que fragmenten iFGF23 hacia cFGF23. Se debe resaltar que, de acuerdo a nuestros resultados, la asociación entre FGF23 e inflamación es tan estrecha que puede observarse con instrumentos analíticos básicos de la práctica clínica diaria como es la *hs*-CRP. Finalmente, se ha descrito que la inflamación tiene efectos indirectos sobre el metabolismo óseo, mediante la modulación de hormonas reproductoras, la secreción y acción de la PTH y de la vitamina D <sup>334</sup>. De forma directa, la inflamación afecta la resorción y la formación ósea alterando el ciclo de remodelado óseo. La inflamación aguda modula el remodelado óseo mediante un incremento simultáneo tanto de la resorción como de la formación ósea. Por el contrario, en estados de inflamación crónica la reabsorción ósea predomina sobre la formación, como consecuencia del efecto promotor de la osteoclastogénesis mediado por citoquinas inflamatorias como el TNF $\alpha$ , la IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 <sup>335</sup>. La resorción ósea secundaria, incrementa la liberación de calcio y fósforo desde el hueso que podrían participar en el incremento de FGF23.

La edad y el género también se han asociado con un aumento de FGF23 <sup>244</sup>. Sin embargo, esta asociación sigue siendo controvertida <sup>279,336</sup>. En los análisis por terciles de fósforo y en modelos de regresión lineal, la edad más joven se asoció con altas concentraciones tanto de iFGF23 como de cFGF23. El aumento de los niveles de FGF23 en pacientes más jóvenes puede reflejar una mayor ingesta de proteínas y fósforo. En nuestro estudio, la edad mostró una correlación inversa con el FGF23, lo que puede atribuirse a una ingesta de fósforo más modesta en pacientes mayores y una menor remodelación ósea con la edad avanzada.

## **12.2 Evaluar la capacidad del filtro de hemodiálisis en la eliminación de FGF23 durante una sesión de hemodiálisis.**

El deterioro de la función renal se acompaña del acumulo de sustancias potencialmente tóxicas para algunas funciones biológicas. En algunos casos, la supervivencia de los sujetos con ERC terminal depende de la correcta eliminación de estas toxinas urémicas mediante técnicas de depuración extracorpórea como la hemodiálisis<sup>337</sup>. La hemodiálisis, utiliza la difusión o transporte por conducción y la ultrafiltración o convección como mecanismos de eliminación de estas toxinas urémicas. La difusión depende de la presencia de gradientes de concentración a cada lado de la membrana semipermeable y del coeficiente de transferencia de masas del dializador mientras que la convección depende de la presencia de un gradiente de presión hidrostática<sup>338</sup>. Por tanto, la eliminación de toxinas urémicas tras su acumulación en estadios avanzados de la ERC es de vital importancia, para reducir la morbilidad y mortalidad asociada<sup>339,340</sup>.

Desde inicio de la pasada década, las toxinas urémicas fueron subdivididas en tres subclases de acuerdo a su peso molecular (PM), solubilidad y su capacidad de unión a proteínas. Las toxinas urémicas pequeñas o de un PM inferior a 0.5 (*kDa*) y escasa o nula unión a proteínas; las de mediano peso molecular (0.5-60 *kDa*) y las de PM bajo pero con gran frecuencia unidas a proteínas, que dificultan su eliminación a través de la membrana del dializador e incluso del glomérulo intacto<sup>341</sup>. De acuerdo con Massry/Koch<sup>342</sup> una autentica toxina urémica debe: estar químicamente identificada y caracterizada, ser medible en líquidos biológicos, sus niveles deben estar elevados en estados de uremia, sus niveles deben estar asociados a manifestaciones clínicas, la reducción de sus niveles debe resultar en una disminución de las manifestaciones asociadas a su incremento y finalmente sus manifestaciones clínicas deben ser reproducibles tras ser inoculada en animales o humanos. En esta línea, iFGF23 (32 *kDa*) y cFGF23 (12 *kDa*) poseen características para ser consideradas toxinas urémicas de mediano tamaño, dado que el incremento de sus niveles se ha asociado al desarrollo de efectos no clásicos algunos de ellos deletéreos<sup>54-57,206,211</sup>.



La capacidad depurativa de estas toxinas urémicas depende en gran medida del dializador, de la técnica de diálisis utilizada y del esquema de tratamiento. La HD de bajo flujo ha demostrado eliminar solutos con  $PM < 5 \text{ kDa}$ . Sin embargo, la HF-HD y la OL-HDF consiguen la eliminación de moléculas con PM superior, con una clara ventaja de la OL-HDF sobre la HF-HD debido a que consigue eliminar moléculas con PM superior<sup>339</sup>. La superficie del dializador que entra en contacto con el compartimiento sanguíneo, el flujo de sangre alcanzado del acceso vascular ( $Q_b$ ), el flujo del líquido de diálisis ( $Q_d$ ), la masa celular en la sangre que entra en contacto con el dializador y el tiempo de duración de la sesión de diálisis, son otros de los factores determinantes de la depuración de solutos y por tanto de la eficiencia de la técnica de diálisis<sup>338,343</sup>. Por otra parte, el coeficiente de cribado (SC) de la membrana del dializador, que se define por la relación entre la concentración del soluto en el ultrafiltrado y el plasma, determina la baja o alta eficacia de la diálisis, cuanto mayor sea el SC mayor es la tasa de aclaramiento de la molécula. La utilización de membranas de alto flujo ha permitido mejorar la depuración de moléculas de mediano PM sin incrementar la pérdida de albumina.

El objetivo de nuestro estudio fue valorar la capacidad de una membrana de diálisis de alto flujo, mediante la técnica de HF-HD en la eliminación de ambas moléculas de FGF23. Para esto, realizamos mediciones de iFGF23 y cFGF23 en 5 pacientes antes del inicio de la sesión de diálisis (pre-HD), a los 5 minutos de iniciada la sesión en el compartimento arterial (pre-Filtro) y venoso (post-Filtro) e inmediatamente antes de finalizar la sesión (post-HD). Adicionalmente, también se realizaron mediciones de calcio, fosfato e iPTH.

Como era de esperar, nuestros resultados confirman cambios en los niveles de calcio, fosfato y PTH durante la sesión de diálisis como ya se había apreciado en otros estudios<sup>344,345</sup>. Por un lado, los niveles de calcio iónico se incrementaron 10% en comparación los niveles pre-HD. Los de fosfato sérico descendieron rápidamente en los primeros 5 minutos de diálisis, para luego incrementarse levemente sin alcanzar los niveles pre-HD, probablemente en relación con la liberación de fosfato desde los hematíes ocasionando

un pequeño efecto rebote. Los niveles de PTH, descendieron una mediana de 75.5%. Un efecto directamente relacionado con los cambios observados en el calcio iónico.

En relación a FGF23 pudimos observar, que mientras que los niveles de iFGF23 se mantuvieron sin cambios en las muestras pre-HD vs. Pre-filtro, pre-HD vs. Post-Filtro y pre-Filtro vs. Post-filtro, estos descendieron alcanzando diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones entre las muestras pre-HD y post-HD con una mediana de reducción del 45.8%. Por otra parte, los niveles de cFGF23 descendieron progresivamente durante la sesión de HD.

Pocos estudios han analizado el efecto del dializador sobre los niveles de FGF23. Adicionalmente, estos estudios han analizado indistintamente una molécula o la otra, pero ninguno ha analizado de forma simultánea ambas moléculas de FGF23. Estudios que han utilizado membranas de bajo flujo no han logrado demostrar que la sesión de diálisis elimine iFGF23 <sup>235,267</sup>. Otro estudio que evaluó la capacidad de la diálisis de eliminar FGF23 con HD convencional demostró una reducción de iFGF23 del 19% <sup>343</sup>, sin embargo, los autores concluyen que esta reducción probablemente estaba asociada a la reducción aguda en los niveles de fosfato sérico durante la sesión de diálisis y no a la técnica de diálisis per se.

Considerando el PM de iFGF23 (32 *kDa*), la utilización de técnicas con dializadores de alto flujo y alto transporte convectivo podría ser de utilidad. En este sentido, un estudio que utilizó la técnica de biofiltración libre de acetato (AFB), <sup>346</sup> utilizando una membrana sintética de alto flujo (AN69 ST) demuestran que iFGF23 se redujo un total del 52.5% y que la principal reducción se observó durante la primera mitad de la sesión. Además, pequeñas cantidades de iFGF23 fueron detectadas en el líquido ultrafiltrado. En relación a este estudio, existen dos puntos importantes a discutir. El primero hace referencia a la capacidad de adsorción intrínseca de algunas membranas sintéticas de diálisis que permite la eliminación de algunas toxinas urémicas. Sin embargo, se presume que el impacto

clínico de este mecanismo de eliminación de solutos sobre la reducción de una molécula en particular es limitado, debido a la rápida saturación de la membrana del dializador durante los primeros minutos de la diálisis. Este hecho podría explicar la mayor reducción de FGF23 durante la primera mitad de la sesión de diálisis.

No obstante, no existen hasta la fecha estudios que evalúen la capacidad de absorción de las diferentes membranas sobre los niveles de FGF23. Recientemente, se ha descrito una nueva técnica de hemodiafiltración con re-insufusión endógena del dializado, en el que este último es re-infundido al paciente, tras su paso por un cartucho que realiza funciones exclusivamente adsorptivas<sup>347</sup>. Sin embargo, esta técnica no ha sido utilizada para valorar el aclaramiento de FGF23. Se requieren estudios que evalúen la capacidad de las distintas técnicas con alto transporte convectivo en el aclaramiento de FGF23. Segundo, los ensayos para la medición de FGF23 disponibles actualmente están validados para su determinación en plasma, existiendo altos coeficientes de variación cuando estas muestras se han medido en diferentes líquidos biológicos<sup>34,325</sup>. Por tanto, no está validada su utilización en muestras diferentes al plasma, por lo que estos resultados obtenidos de la determinación de FGF23 en el líquido ultrafiltrado podrían tener una cuestionable interpretación.

Estudios publicados posteriormente al análisis de resultados de esta tesis doctoral, evaluaron la capacidad de una membrana de polisulfona de alto flujo (Fx100 de Fresenius Medical Care y diámetro interno de la fibra de 185  $\mu\text{m}$ ) y distintas modalidades de OL-HDF (pre-dilución, post-dilución y Mid-dilucional con un filtro FxCordiax 1000 con un diámetro interno de la fibra de 210  $\mu\text{m}$ ) en la eliminación de diferentes moléculas con PM medio y alto<sup>348</sup>. A priori, estos filtros poseen una mayor permeabilidad de la membrana y una geometría de las fibras, que favorece el aclaramiento de moléculas de mayor PM. Comparativamente, el porcentaje de reducción de iFGF23 fue de 34.8% con HF-HD y del 55.5, 54.5 y 53.2% para las modalidades OL-HDF post-dilucional, mid-dilucional y pre-dilucional respectivamente. En nuestro estudio, el porcentaje de reducción de iFGF23 fue comparable al del estudio mencionado anteriormente<sup>348</sup> con un 45.8% vs. 34.8% respectivamente. Estas mínimas diferencias podrían estar sustentadas en las diferentes superficies del dializador y en el Qb utilizado durante las sesiones de HF-HD. Nuestro estudio no realizó sesiones de OL-HDF por lo que los resultados no

pueden ser comparados.

En relación a cFGF23 (PM 12 *kDa*), los sujetos con HD diaria corta domiciliaria, muestran niveles de cFGF23 inferiores a sujetos que reciben HD convencional de bajo flujo.

Debido a la naturaleza transversal del estudio, no podemos inferir que los menores niveles de cFGF3 en los sujetos en HD diaria domiciliaria sean debido a la técnica, sino por el contrario a una menor carga de fosfato y de PTH.

Un estudio que comparó la eliminación de cFGF23 entre HF-HD y OL-HDF (post-dilucional) demostró que el porcentaje de reducción de cFGF23 fue del 36.2 y del 55.7% respectivamente <sup>323</sup>. Similares resultados se obtuvieron en otro estudio en que los sujetos fueron incluidos en un estudio cruzado, valorando el efecto de diferentes modalidades de HD en diferentes periodos de tiempo <sup>349</sup>. Los sujetos en OL-HDF, y principalmente aquellos en OL-HDF de 8 horas de duración fueron los que mostraron porcentajes de reducción superiores. Estos resultados no son sorprendentes dado que el PM del cFGF23 es comparable al de la  $\beta$ 2-microglobulina (11.8 *kDa*). La habilidad de las terapias con alto transporte convectivo, para la eliminación de moléculas con PM similar al de la  $\beta$ 2-microglobulina está ampliamente demostrado <sup>350</sup>.

A la vista de la evidencia actual, las técnicas de alto flujo, principalmente aquellas con alto transporte convectivo parecen ser idóneas en la eliminación de FGF23. Se precisan ensayos clínicos aleatorizados comparando las diferentes técnicas y modalidades, para poder hacer recomendaciones definitivas acerca del aclaramiento de FGF23 mediante técnicas de HD. La mayor capacidad de las técnicas con alto transporte convectivo en el aclaramiento de FGF23, podría consolidar la evidencia demostrada del efecto beneficioso de estas técnicas sobre la mortalidad del paciente en hemodiálisis <sup>339</sup>. Dado que la HF-HD es la técnica de HD utilizada con mayor proporción en la mayoría de países occidentales <sup>351,352</sup>, es de vital importancia la demostración de su capacidad para la eliminación de FGF23, dado su impacto sobre la supervivencia de pacientes en HD <sup>44,49</sup>.

**12.3 Analizar si los niveles sanguíneos de FGF23 sufren modificaciones agudas durante el transcurso de la hemodiálisis. Se valorará si estos cambios se correlacionan con alguno de los factores relacionados con su producción como son los niveles plasmáticos de fosfato, calcio y hormona paratiroidea (PTH) o si por el contrario los cambios en FGF23 están determinados por la diálisis *per se*.**

En vista de los resultados anteriores, se procedió a evaluar si el cambio en FGF23 durante la sesión de HD se asociaba a la técnica de diálisis o a las modificaciones agudas en los niveles de fosfato, calcio y PTH. En el primer capítulo se describieron los principales factores asociados al incremento de FGF23. En este contexto, la posibilidad de que cambios agudos en estas variables predictoras se asociaran a cambios agudos en FGF23 gana relevancia. Para esto, 15 sujetos fueron incluidos en un estudio cruzado abierto, en el que los sujetos fueron sometidos a sesiones de hemodiálisis en dos periodos diferentes, modificando la cantidad de calcio contenido en el líquido de diálisis. El resto de variables determinantes del aclaramiento de una molécula durante la diálisis, como el Qb, Qd, tiempo de la sesión, superficie del dializador se mantuvieron estables durante el estudio.

Varios estudios han evaluado el efecto de las diferentes variables asociadas al incremento de FGF23 en el contexto crónico <sup>233,353</sup>. Sin embargo, el efecto agudo de estas variables, sobre los niveles circulantes de FGF23 no ha logrado demostrar, que las variaciones rápidas en estas variables, vayan acompañadas de cambios en FGF23. En sujetos sanos, la ingesta de una dieta con alto contenido de fosfato se acompañó de un incremento en los niveles sanguíneos de PTH y de la fracción de excreción de fosfato aunque iFGF23 no sufrió modificaciones <sup>232</sup>. Otro estudio en sujetos sanos demostró un incremento en los niveles de iFGF23 tras la ingesta de una dieta rica en calcio y fosfato aunque este incremento era dependiente del ritmo circadiano <sup>233</sup>. En sujetos con ERC, se ha demostrado que la ingesta de una dieta con alto contenido en fosfato, no se asoció a cambios en los niveles circulantes de iFGF23 <sup>26</sup>.

En nuestro estudio, los niveles de fosfato se redujeron en un porcentaje similar,

independientemente de la concentración de calcio utilizada en el líquido de diálisis.

En esta misma línea, los niveles de iFGF23 se redujeron de forma significativa en ambas sesiones de diálisis, aunque el porcentaje de reducción fue superior cuando se utilizó una concentración de calcio de 3 mEq/l, en comparación a una concentración de 2.5 mEq/l, 57.0% vs. 39.5%. Sin embargo, no se encontró correlación entre el cambio de fosfato y ambas moléculas de FGF23. El porcentaje de reducción de cFGF23 fue similar en ambas sesiones de diálisis, independientemente de la concentración de calcio utilizada. El hecho de que a un comparable Qb, Qd, tiempo de diálisis y Kt alcanzado durante la sesión de diálisis, el porcentaje de reducción de cFGF23 sea comparable, apoya la idea de que FGF23 es aclarado a través de la membrana de diálisis utilizada (Fx60 Cordiax).

El hallazgo más relevante de este estudio, fue la asociación entre el cambio en los niveles de calcio iónico y el cambio en iFGF23. Este efecto es independiente del cambio en el fosfato, la PTH o del tiempo de duración de la sesión de diálisis. De forma interesante, los niveles pre-HD de calcitriol parecen interferir en la reducción de iFGF23. Estudios previos habían demostrado el efecto del calcio sobre los niveles circulantes de iFGF23<sup>43,243</sup>. Sin embargo, los trabajos que evaluaron el efecto de los cambios agudos en los niveles de calcio sobre FGF23 no han mostrado ningún efecto<sup>70,354</sup>. Las diferencias observadas con respecto a nuestro estudio podrían estar sustentadas en las diferencias metodológicas utilizadas. Mientras que en nuestro estudio, los pacientes fueron expuestos a concentraciones diferentes de calcio en el líquido de diálisis en dos sesiones de diálisis diferentes, otro estudio<sup>70</sup>, utilizó una concentración de calcio de 3.5 mEq/l durante los primeros 150 minutos de la sesión de diálisis, para luego ser expuestos a una concentración de calcio en el líquido de 2.5 mEq/l hasta el final de la sesión de diálisis. En una segunda sesión, los pacientes fueron expuestos a una concentración de calcio en el líquido de diálisis de 2.5 mEq/l durante toda la sesión de HD. De esta forma, los autores consiguieron una reducción de iFGF23 del 21% en la sesión de diálisis con una exposición de calcio en el líquido de 3.5 mEq/l y del 3% en la sesión de calcio en el líquido de 2.5 mEq/l. Es de destacar, que los autores de este estudio concluyen que si bien

no existió una asociación entre el cambio en iFGF23 y los cambios en el calcio y la PTH, los niveles pre-HD de iFGF23 determinaron la respuesta de la PTH a la supresión promovida por el calcio sérico, de tal forma, que cuanto más altos son los niveles pre-HD de iFGF23 menor es la respuesta de la PTH al efecto supresor del calcio <sup>70</sup>.

En este sentido, consideramos que la utilización de una concentración de calcio prohibitiva (3.5 mEq/l), en la práctica clínica podría haber influido los resultados, dado que los niveles de calcio elevados han demostrado interferir en la reducción de iFGF23 mediada por el uso de calcimiméticos <sup>44</sup>. Nuestros resultados, al igual que los del estudio mencionado anteriormente, no están influenciados por la medicación utilizada para el tratamiento de HPTS ya que el uso de paricalcitol o cinalcalcet era un criterio de exclusión en ambos estudios.

Otro estudio que incluyó pacientes en HD y en DP <sup>354</sup>, sometió a los pacientes a infusión intravenosa de citrato cálcico y gluconato cálcico en el periodo interdiálisis. Durante el día de la administración, los sujetos no recibieron ni HD ni DP. Los niveles de iFGF23 no se modificaron tras la infusión de citrato ni de gluconato cálcico a pesar de cambios en los niveles de PTH durante la infusión de gluconato cálcico. Por tanto, los cambios observados en los niveles de calcio, fosfato y PTH no se asociaron a cambios en FGF23. Una limitación de este estudio que podría explicar los diferentes resultados es que los sujetos en DP recibían una concentración de calcio en el líquido de diálisis de 2.5 mEq/l, mientras que en HD utilizaban una concentración de calcio en el líquido de diálisis de 2 mEq/l. Aunque es improbable que estas variables influyesen los resultados dado que el estudio fue realizado en periodos libres de diálisis.

Como se mencionó anteriormente, existen reguladores óseos de la producción de iFGF23 como PHEX y DMP1 <sup>268</sup>. La inhibición de PHEX se ha asociado al incremento en iFGF23 y su sobreexpresión en un descenso de iFGF23 <sup>268</sup>. Un estudio in vitro, ha demostrado que la infusión de bajas concentraciones de calcio sobre cultivos de osteoblastos, promueve un incremento en la expresión de PHEX. Este efecto se suprime tras el

incremento en la concentración de calcio infundido <sup>355</sup>. Aunque faltan estudios que lo confirmen, el efecto ejercido por el calcio sobre iFGF23, observado en nuestro estudio podría ser explicado por un efecto dual del calcio sobre la producción de iFGF23. Por tanto, una posibilidad es, que los cambios rápidos de calcio favorecidos por la sesión de diálisis promuevan una sobreexpresión de PHEX, que inhiba iFGF23 circulante y que posteriormente, se alcance un punto de saturación en donde se observe el efecto contrario, supresión de PHEX e incremento de iFGF23. También es posible, que este efecto sea mediado por los cambios cíclicos observados en los niveles de calcio en los periodos interdiálisis.

No obstante, esta hipótesis es especulativa y requiere estudios que lo confirmen.

En la actualidad, la concentración de calcio ideal a utilizar durante la sesión de hemodiálisis continua siendo controvertida, a pesar del consenso general de evitar concentraciones de calcio muy elevadas, que favorezcan un incremento en la carga de calcio <sup>308,356</sup>. En contrapartida, la utilización de concentraciones de calcio muy bajas (<2.5 mEq/l) se asocian a un incremento en el riesgo de hipocalcemia sintomática, hipotensión, el número de hospitalizaciones asociadas a insuficiencia cardíaca y arritmias. Además, se observa un incremento en los niveles de fosfato, PTH y del uso captores de fosfato <sup>308</sup>.

De acuerdo con estos resultados y de forma comparativa con los nuestros, que demuestran una reducción de iFGF23 con una concentración de calcio de 2.5—3 mEq/l, y a la espera de más estudios que logren reproducir nuestros resultados, consideramos que esta es la concentración de calcio recomendable en pacientes en HD. No obstante, las características individuales de cada paciente y sus co-morbilidades, deben ser los pilares fundamentales sobre los que se sustente la concentración de calcio en el líquido de diálisis. Obviamente, la individualización podría acarrear costes en tecnología, y en determinaciones sanguíneas más frecuentes, que encarezcan la terapia dialítica.



#### **12.4 Valorar si los cambios mantenidos en la concentración de fosfato regulan los niveles de FGF23 (iFGF23 y cFGF23) en pacientes en hemodiálisis.**

Tras demostrar la robusta influencia del fosfato sérico sobre los niveles de FGF23, se procedió a realizar un estudio en el que se valoró si los cambios en el fosfato sérico, su incremento o descenso, eran seguidos por cambios equivalentes en FGF23. Para la consecución de este objetivo, 21 sujetos fueron seguidos de forma longitudinal, valorando de forma periódica sus niveles de fosfato sérico y los cambios equivalentes en FGF23. Los niveles objetivos de fosfato sérico fueron los recomendados por la SEN, las guías KDIGO y el estudio COSMOS <sup>16,64,357</sup>.

En pacientes con ERC, el control del fosfato sérico reduce los niveles de FGF23 <sup>39,40,358</sup>. Sin embargo, los estudios que demuestran este efecto en pacientes con HD son limitados. Clásicamente, los niveles elevados de fosfato sérico se han asociado al incremento de la mortalidad en pacientes en hemodiálisis <sup>61,296</sup>. Consecuentemente, uno de los principales objetivos a considerar en pacientes con ERC y aquellos que reciben HD, es la de evitar el incremento del fosfato sérico por encima de los niveles objetivo recomendados <sup>16,64</sup>. Si adicionamos el efecto sobre la mortalidad asociado al incremento de FGF23 <sup>6,49,71</sup>, la reducción de ambas moléculas es necesaria en especial aquellos en HD.

El balance de fosfato en paciente con ERC-HD depende principalmente del balance entre la ingesta y su absorción intestinal, el proveniente del remodelado óseo y la eliminación mediante las técnicas de diálisis. Aunque la restricción en el consumo de fosfato es la primera línea de tratamiento para el tratamiento de la hiperfosfatemia, en la mayoría de los casos estas medidas son insuficientes debido que el fosfato inorgánico, con un índice de absorción superior en comparación al fosfato orgánico y vegetal, se utiliza cada vez con mayor frecuencia como aditivo de alimentos procesados <sup>359</sup>. En esta línea, el uso de captadores de fosfato ha demostrado ser una de las terapias más efectivas para el tratamiento de la hiperfosfatemia en pacientes en HD <sup>62,63,248,296</sup>.

En particular, el uso de captadores sin contenido cálcico, se ha asociado a un descenso de la mortalidad por todas las causas en comparación con el uso de captadores con contenido cálcico <sup>296</sup>, probablemente por la asociación existente entre estos últimos y el desarrollo de calcificaciones coronarias <sup>63,137</sup>.

Nuestros resultados demuestran, que la elevación o descenso en los niveles de fosfato sérico se asocia a cambios directamente proporcionales en FGF23. En concreto, se observó que la reducción del fosfato sérico por debajo del objetivo de 4,5 mg/dl, se asoció con una disminución del iFGF23 del 63.8%. Sin embargo, la concentración de cFGF23 no se modificó. Por el contrario, en los sujetos en quienes el objetivo de fosfato sérico no se alcanzó, tanto iFGF23 como cFGF23 se incrementaron un 65.3% y un 200% respectivamente. En línea con nuestra hipótesis, la magnitud del cambio en los niveles de fosfato sérico, se correlaciona con la magnitud en el cambio de FGF23. El porcentaje de reducción de FGF23 parece ser tiempo dependiente, de tal forma que cuanto mayor es el tiempo en el que los niveles de fosfato se mantienen controlados, mayor es el descenso de FGF23. Mientras que en un estudio con 4 semanas de duración demostró que el control del fosfato durante 4 semanas, se asoció al descenso de FGF23 del 22% <sup>360</sup>, otro trabajo con una duración de 54 semanas, se asoció a una reducción de FGF23 similar a la observada en nuestro estudio, 67% <sup>62</sup>. Por tanto, cuanto mayor sea el tiempo de descenso de los niveles de fosfato, mayor será el impacto sobre los niveles circulantes de FGF23.

Otro hallazgo que merece la pena destacar de nuestros resultados, es que el control del fosfato sérico también fue acompañado por una reducción proporcional en los niveles séricos de *hs*-CRP. La existencia de una relación directamente proporcional entre el cambio en los niveles de *hs*-CRP y ambas moléculas de FGF23 (*hs*-CRP vs. iFGF23, 49%, y *hs*-CRP vs cFGF23, 61%), resalta la importancia de nuestros resultados. Desde hace algún tiempo, ya conocíamos la estrecha relación entre la hiperfosfatemia y el proceso inflamatorio en pacientes con ERC <sup>237</sup> que puede ser revertida parcialmente mediante el uso de captadores de fosfato <sup>248</sup>. Estudios en modelos animales con ERC, han demostrado recientemente una estrecha relación bidireccional entre la inflamación y

FGF23. La inducción de inflamación tanto crónica como aguda se asoció al incremento en la transcripción y proteólisis de FGF23 <sup>48</sup>. Además, FGF23 promueve la producción hepatocitaria de IL-6 y *hs*-CRP <sup>55</sup>. Lo anterior demuestra la estrecha relación existente entre la inflamación y la producción y proteólisis de FGF23. Nuestro estudio, es pionero en demostrar en pacientes en HD esta asociación. Nuestros resultados no solo demuestran que los niveles de fosfato sérico se asocian de forma positiva con los niveles de *hs*-CRP, sino también, que la inflamación medida por los niveles de *hs*-CRP, se asocian de forma independiente al incremento de iFGF23 y cFGF23. Pero más importante es el hecho, que el control en los niveles de fosfato, no solo se asoció al descenso de *hs*-CRP, sino también de ambas moléculas de FGF23. Además, también existió una asociación directamente proporcional entre el descenso de la *hs*-CRP y ambas moléculas de FGF23. Consecuentemente, una vez conseguida la reducción en los niveles de fosfato sérico, se deben considerar medidas terapéuticas que favorezcan la reducción del proceso inflamatorio y evitar el incremento en los niveles de calcio sérico. En nuestro estudio, no podemos dilucidar si el responsable directo de la reducción de FGF23, fue el descenso del fosfato sérico o si solo se trata de un factor adicional sumado al descenso de marcadores inflamatorios, que reducen la producción de FGF23. Adicionalmente, la reducción en los niveles de PTH pueden haber contribuido a la disminución en iFGF23 <sup>238</sup>. Lo contrario, aplica en los pacientes en quienes no se logró controlar el fosfato sérico en los que el aumento de PTH y CRP pudieron haber contribuido a la elevación de iFGF23 y cFGF23. Por lo tanto, nuestro estudio apoya la idea de que el control de FGF23 a través de una reducción en el fosfato sérico puede mejorar el estado inflamatorio en pacientes en hemodiálisis. Una vez más queda demostrada, en esta ocasión en pacientes en HD, la estrecha interrelación entre estas tres variables, fosfato, inflamación y FGF23.

Otro hallazgo, que reitera el efecto ya conocido del fosfato sérico sobre la producción de PTH, es el hecho de que la reducción progresiva del fosfato sérico, se acompañó de una disminución de la PTH, independientemente del cambio en el calcio sérico, lo que confirma que la PTH está directamente regulada por el fosfato o por una reducción de la resistencia esquelética a la PTH <sup>102</sup>.

### ***13. CONCLUSIONES FINALES***

1. Existe una regulación diferencial de ambas moléculas de FGF23, de tal forma que, algunos de los factores asociados a la elevación de iFGF23 no tienen ninguna influencia sobre el incremento de cFGF23 y viceversa.
2. Los principales factores responsables del incremento de iFGF23 son el fosfato, el calcio sérico y en menor medida la inflamación. El efecto del calcio sobre la elevación de iFGF23 es más relevante con niveles normales de fosfato, sugiriendo la existencia de un umbral a partir del cual el efecto del calcio sérico es más relevante. En contraposición, el principal determinante del aumento del cFGF23, además del fosfato, es la inflamación y el tiempo de permanencia de los pacientes en diálisis. Los niveles de calcio sérico parecen no influir en la elevación de cFGF23.
3. La edad avanzada se asocia a niveles más bajos de FGF23. Es probable, que la menor ingesta de proteínas y por tanto de fosfato, así como un menor remodelado óseo favorezcan niveles más bajos de FGF23.
4. La reducción de cFGF23 durante la HD podría estar determinada por el aclaramiento de la molécula a través del dializador. Los cambios de iFGF23, en cambio, podrían depender de variaciones en los niveles de calcio sérico durante la sesión de diálisis.
5. Los cambios a mediano plazo en el fosfato sérico se asocian a modificaciones en FGF23. El incremento o descenso de fosfato favorece cambios paralelos en los

niveles circulantes de FGF23. Sin embargo, los cambios agudos de fosfato no producen variaciones en FGF23.

6. Existe una estrecha relación entre los niveles de fosfato sérico y marcadores de inflamación como la proteína C-reactiva. Al igual que con FGF23, los cambios en los niveles de fosfato sérico se asocian a cambios directamente proporcionales en parámetros inflamatorios.
  
7. La identificación de los factores que contribuyen al incremento de FGF23 en pacientes en HD es fundamental para el desarrollo de medidas terapéuticas dirigidas a reducir sus niveles. La asociación de FGF23 con el incremento en la morbilidad y mortalidad de sujetos con ERC, le confiere propiedades más allá de ser un biomarcador y lo propone como un potencial objetivo terapéutico. Estudios longitudinales deberán evaluar el efecto beneficioso de la reducción de FGF23 sobre la supervivencia.

## 14. REFERENCIAS

1. Gorostidi M, Santamaria R, Alcazar R, et al. Spanish Society of Nephrology document on KDIGO guidelines for the assessment and treatment of chronic kidney disease. *Nefrologia*. 2014;34(3):302-316. doi:10.3265/Nefrologia.pre2014.Feb.12464
2. Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKD-MBDWG. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl*. 2009;(113):S1-130. doi:10.1038/ki.2009.188
3. Ortiz A, Sanchez-Niño MD, Crespo-Barrio M, et al. The Spanish Society of Nephrology (SENEFRO) commentary to the Spain GBD 2016 report: Keeping chronic kidney disease out of sight of health authorities will only magnify the problem. *Nefrologia*. 2019;39(1):29-34. doi:10.1016/j.nefro.2018.09.002
4. Mirza MA, Larsson A, Lind L, Larsson TE. Circulating fibroblast growth factor-23 is associated with vascular dysfunction in the community. *Atherosclerosis*. 2009;205(2):385-390. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.01.001
5. Bernheim J, Benchetrit S. The potential roles of FGF23 and Klotho in the prognosis of renal and cardiovascular diseases. *Nephrol Dial Transpl*. 2011;26(8):2433-2438. doi:10.1093/ndt/gfr208
6. Isakova T, Xie H, Yang W, et al. Fibroblast Growth Factor 23 and Risks of Mortality and End-Stage Renal Disease in Patients With Chronic Kidney Disease. *Jama*. 2011;305(23):2432-2439. doi:10.1001/jama.2011.826
7. Cunningham J, Locatelli F, Rodriguez M. Secondary Hyperparathyroidism: Pathogenesis, Disease Progression, and Therapeutic Options. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(4):913-921. doi:10.2215/CJN.06040710
8. Evenepoel P, Rodriguez M, Ketteler M. Laboratory abnormalities in CKD-MBD: markers, predictors, or mediators of disease? *Semin Nephrol*. 2014;34(2):151-163. doi:10.1016/j.semnephrol.2014.02.007
9. Felsenfeld AJ, Levine BS, Rodriguez M. Pathophysiology of Calcium, Phosphorus, and Magnesium Dysregulation in Chronic Kidney Disease. *Semin Dial*. 2015;28(6):564-577. doi:10.1111/sdi.12411
10. Rodriguez M, Lopez I, Munoz J, Aguilera-Tejero E, Almaden Y. FGF23 and mineral metabolism, implications in CKD-MBD. *Nefrologia*. 2012;32(3):275-278. doi:10.3265/Nefrologia.pre2012.Mar.11415
11. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. Remuzzi G, ed. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158765. doi:10.1371/journal.pone.0158765

12. Wang V, Vilme H, Maciejewski ML, Boulware LE. The Economic Burden of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease. *Semin Nephrol.* 2016;36(4):319-330. doi:10.1016/j.semnephrol.2016.05.008
13. Elias RM, Dalboni MA, Coelho ACE, Moysés RMA. CKD-MBD: from the Pathogenesis to the Identification and Development of Potential Novel Therapeutic Targets. *Curr Osteoporos Rep.* 2018;16(6):693-702. doi:10.1007/s11914-018-0486-0
14. Herzog CA, Asinger RW, Berger AK, et al. Cardiovascular disease in chronic kidney disease. A clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2011;80(6):572-586. doi:10.1038/ki.2011.223
15. Valdivielso JM. [Vascular calcification: types and mechanisms]. *Nefrologia.* 2011;31(2):142-147. doi:10.3265/Nefrologia.pre2010.Nov.10754
16. Torregrosa J V, Bover J, Cannata Andia J, et al. Spanish Society of Nephrology recommendations for controlling mineral and bone disorder in chronic kidney disease patients (S.E.N.-M.B.D.). *Nefrologia.* 2011;31 Suppl 1:3-32. doi:10.3265/Nefrologia.pre2011.Jan.10816
17. Cannata-Andia J, Torregrosa J V. Spanish nephrologists and the management of mineral and bone metabolism disorders in chronic kidney disease. *Nefrologia.* 2014;34(2):175-188. doi:10.3265/Nefrologia.pre2014.Jan.12280
18. Ketteler M, Elder GJ, Evenepoel P, et al. Revisiting KDIGO clinical practice guideline on chronic kidney disease-mineral and bone disorder: a commentary from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes controversies conference. *Kidney Int.* 2015;87(3):502-528. doi:10.1038/ki.2014.425
19. Liu S, Quarles LD. How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(6):1637-1647. doi:10.1681/ASN.2007010068
20. Felsenfeld AJ, Levine BS, Kleeman CR. Fuller Albright and our current understanding of calcium and phosphorus regulation and primary hyperparathyroidism. *Nefrologia.* 2011;31(3):346-357. doi:10.3265/Nefrologia.pre2011.Mar.10774
21. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 1997;390(6655):45-51. doi:10.1038/36285
22. Kuro OM. Phosphate and Klotho. *Kidney Int Suppl.* 2011;(121):S20-3. doi:10.1038/ki.2011.26
23. Kuro-O M, Kuro OM. A phosphate-centric paradigm for pathophysiology and therapy of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2013;3(5):420-426. doi:10.1038/kisup.2013.88
24. Silver J, Rodriguez M, Slatopolsky E. FGF23 and PTH--double agents at the heart of CKD. *Nephrol Dial Transpl.* 2012;27(5):1715-1720. doi:10.1093/ndt/gfs050

25. Young EW, Albert JM, Satayathum S, et al. Predictors and consequences of altered mineral metabolism: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. *Kidney Int.* 2005;67(3):1179-1187. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00185.x
26. Isakova T, Gutierrez O, Shah A, et al. Postprandial mineral metabolism and secondary hyperparathyroidism in early CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(3):615-623. doi:10.1681/ASN.2007060673
27. Mirza MA, Larsson A, Melhus H, Lind L, Larsson TE. Serum intact FGF23 associate with left ventricular mass, hypertrophy and geometry in an elderly population. *Atherosclerosis.* 2009;207(2):546-551. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.05.013
28. Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many T. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *Am J Physiol Ren Physiol.* 2010;299(4):F882-9. doi:10.1152/ajprenal.00360.2010
29. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest.* 2007;117(12):4003-4008. doi:10.1172/JCI32409
30. Torres PA, De Brauwere DP. Three feedback loops precisely regulating serum phosphate concentration. *Kidney Int.* 2011;80(5):443-445. doi:10.1038/ki.2011.146
31. Wolf M, White KE. Coupling fibroblast growth factor 23 production and cleavage: iron deficiency, rickets, and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014;23(4):411-419. doi:10.1097/01.mnh.0000447020.74593.6f
32. Smith ER, Cai MM, McMahon LP, Holt SG. Biological variability of plasma intact and C-terminal FGF23 measurements. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(9):3357-3365. doi:10.1210/jc.2012-1811
33. Berndt TJ, Craig TA, McCormick DJ, et al. Biological activity of FGF-23 fragments. *Pflugers Arch.* 2007;454(4):615-623. doi:10.1007/s00424-007-0231-5
34. Smith ER, McMahon LP, Holt SG. Method-specific differences in plasma fibroblast growth factor 23 measurement using four commercial ELISAs. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(10):1971-1981. doi:10.1515/cclm-2013-0208
35. Bożentowicz-Wikarek M, Owczarek A, Kocelak P, Olszanecka-Glinianowicz M, Więcek A, Chudek J. C-Terminal to Intact Fibroblast Growth Factor 23 Ratio in Relation to Estimated Glomerular Filtration Rate in Elderly Population. *Kidney Blood Press Res.* 2016;41(5):519-526. doi:10.1159/000443452
36. Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(1):124-136. doi:10.1681/ASN.2009121311
37. Wang X, Sun Z. RNAi silencing of brain klotho potentiates cold-induced elevation of blood pressure via the endothelin pathway. *Physiol Genomics.* 2010;41(2):120-126. doi:10.1152/physiolgenomics.00192.2009



38. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis.* 1998;31(4):607-617. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9531176>.
39. Isakova T, Barchi-Chung A, Enfield G, et al. Effects of dietary phosphate restriction and phosphate binders on FGF23 levels in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(6):1009-1018. doi:10.2215/CJN.09250912
40. Soriano S, Ojeda R, Rodriguez M, et al. The effect of phosphate binders, calcium and lanthanum carbonate on FGF23 levels in chronic kidney disease patients. *Clin Nephrol.* 2013;80(1):17-22. doi:10.5414/CN107764
41. Vervloet MG, Sezer S, Massy ZA, et al. The role of phosphate in kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(1):27-38. doi:10.1038/nrneph.2016.164
42. Rodriguez-Ortiz ME, Rodriguez M. FGF23 as a calciotropic hormone. *F1000Res.* 2015;4. doi:10.12688/f1000research.7189.1
43. Rodriguez-Ortiz ME, Lopez I, Munoz-Castaneda JR, et al. Calcium Deficiency Reduces Circulating Levels of FGF23. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(7):1190-1197. doi:10.1681/ASN.2011101006
44. Moe SM, Chertow GM, Parfrey PS, et al. Cinacalcet, Fibroblast Growth Factor-23, and Cardiovascular Disease in Hemodialysis: The Evaluation of Cinacalcet HCl Therapy to Lower Cardiovascular Events (EVOLVE) Trial. *Circulation.* 2015;132(1):27-39. doi:10.1161/circulationaha.114.013876
45. Meir T, Durlacher K, Pan Z, et al. Parathyroid hormone activates the orphan nuclear receptor Nurr1 to induce FGF23 transcription. *Kidney Int.* 2014;86(6):1106-1115. doi:10.1038/ki.2014.215
46. Lopez I, Rodriguez-Ortiz ME, Almaden Y, et al. Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Kidney Int.* 2011;80(5):475-482. doi:10.1038/ki.2011.107
47. Takahashi H, Komaba H, Takahashi Y, et al. Impact of parathyroidectomy on serum FGF23 and soluble Klotho in hemodialysis patients with severe secondary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(4):E652-8. doi:10.1210/jc.2013-4050
48. David V, Martin A, Isakova T, et al. Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production. *Kidney Int.* 2016;89(1):135-146. doi:10.1038/ki.2015.290
49. Gutierrez OM, Mannstadt M, Isakova T, et al. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.* 2008;359(6):584-592. doi:10.1056/NEJMoa0706130
50. Munoz Mendoza J, Isakova T, Cai X, et al. Inflammation and elevated levels of fibroblast growth factor 23 are independent risk factors for death in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2017;91(3):711-719. doi:10.1016/j.kint.2016.10.021

51. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(8):2208-2218. doi:10.1097/01.ASN.0000133041.27682.A2
52. Yeun JY, Levine RA, Mantadilok V, Kaysen GA. C-Reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2000;35(3):469-476. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10692273>.
53. Nakanishi S, Kazama JJ, Nii-Kono T, et al. Serum fibroblast growth factor-23 levels predict the future refractory hyperparathyroidism in dialysis patients. *Kidney Int.* 2005;67(3):1171-1178. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00184.x
54. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4393-4408. doi:10.1172/jci46122
55. Singh S, Grabner A, Yanucil C, et al. Fibroblast growth factor 23 directly targets hepatocytes to promote inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2016;90(5):985-996. doi:10.1016/j.kint.2016.05.019
56. Rossaint J, Oehmichen J, Van Aken H, et al. FGF23 signaling impairs neutrophil recruitment and host defense during CKD. *J Clin Invest.* 2016;126(3):962-974. doi:10.1172/JCI83470
57. Rodelo-Haad C, Santamaria R, Muñoz-Castañeda JR, Pendón-Ruiz de Mier MV, Martín-Malo A, Rodríguez M. FGF23, Biomarker or Target? *Toxins (Basel).* 2019;11(3):175. doi:10.3390/toxins11030175
58. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med.* 2004;351(13):1296-1305. doi:10.1056/NEJMoa041031
59. Foley RN, Murray AM, Li S, et al. Chronic kidney disease and the risk for cardiovascular disease, renal replacement, and death in the United States Medicare population, 1998 to 1999. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(2):489-495. doi:10.1681/ASN.2004030203
60. Torres PA, De Broe M. Calcium-sensing receptor, calcimimetics, and cardiovascular calcifications in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2012;82(1):19-25. doi:10.1038/ki.2012.69
61. Rodríguez-Benot A, Martín-Malo A, Álvarez-Lara MA, Rodríguez M, Aljama P. Mild hyperphosphatemia and mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2005;46(1):68-77. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983959>.
62. Cancela AL, Oliveira RB, Gracioli FG, et al. Fibroblast growth factor 23 in hemodialysis patients: effects of phosphate binder, calcitriol and calcium concentration in the dialysate. *Nephron Clin Pr.* 2011;117(1):c74-82. doi:10.1159/000319650
63. Block GA, Wheeler DC, Persky MS, et al. Effects of phosphate binders in moderate CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(8):1407-1415. doi:10.1681/ASN.2012030223

64. Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, et al. Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: what's changed and why it matters. *Kidney Int.* 2017;92(1):26-36. doi:10.1016/j.kint.2017.04.006
65. Sprague SM, Wetmore JB, Gurevich K, et al. Effect of Cinacalcet and Vitamin D Analogs on Fibroblast Growth Factor-23 during the Treatment of Secondary Hyperparathyroidism. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(6):1021-1030. doi:10.2215/CJN.03270314
66. Wetmore JB, Liu S, Krebill R, Menard R, Quarles LD. Effects of cinacalcet and concurrent low-dose vitamin D on FGF23 levels in ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(1):110-116. doi:10.2215/CJN.03630509
67. Wetmore JB, Gurevich K, Sprague S, et al. A Randomized Trial of Cinacalcet versus Vitamin D Analogs as Monotherapy in Secondary Hyperparathyroidism (PARADIGM). *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(6):1031-1040. doi:10.2215/CJN.07050714
68. Komaba H, Taniguchi M, Wada A, Iseki K, Tsubakihara Y, Fukagawa M. Parathyroidectomy and survival among Japanese hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.* 2015;88(2):350-359. doi:10.1038/ki.2015.72
69. Zaritsky J, Rastogi A, Fischmann G, et al. Short daily hemodialysis is associated with lower plasma FGF23 levels when compared with conventional hemodialysis. *Nephrol Dial Transpl.* 2014;29(2):437-441. doi:10.1093/ndt/gft382
70. Wetmore JB, Santos PW, Mahnken JD, et al. Elevated FGF23 levels are associated with impaired calcium-mediated suppression of PTH in ESRD. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(1):E57-64. doi:10.1210/jc.2010-1277
71. Block GA, Kilpatrick RD, Lowe KA, Wang W, Danese MD. CKD-mineral and bone disorder and risk of death and cardiovascular hospitalization in patients on hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(12):2132-2140. doi:10.2215/cjn.04260413
72. Bover J, Ureña-Torres P, Górriz JL, et al. Cardiovascular calcifications in chronic kidney disease: Potential therapeutic implications. *Nefrologia.* 2016;36(6):597-608. doi:10.1016/j.nefro.2016.05.023
73. Wanner C, Krane V, März W, et al. Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.* 2005;353(3):238-248. doi:10.1056/NEJMoa043545
74. Portillo MR, Rodríguez-Ortiz ME. Secondary Hyperparathyroidism: Pathogenesis, Diagnosis, Preventive and Therapeutic Strategies. *Rev Endocr Metab Disord.* 2017;18(1):79-95. doi:10.1007/s11154-017-9421-4
75. Kovesdy CP, Quarles LD, Sprague SM, et al. FGF23 and mineral metabolism, implications in CKD-MBD. *Nephrol Dial Transpl.* 2012;10(9):1021-1030. doi:10.1681/ASN.2011101006

76. Rodríguez M, Rodríguez-Ortiz ME. Advances in pharmacotherapy for secondary hyperparathyroidism. *Expert Opin Pharmacother.* 2015;16(11):1703-1716. doi:10.1517/14656566.2015.1061994
77. Cunningham J, Locatelli F, Rodriguez M. Secondary hyperparathyroidism: pathogenesis, disease progression, and therapeutic options. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(4):913-921. doi:10.2215/CJN.06040710
78. Isakova T, Ix JH, Sprague SM, et al. Rationale and Approaches to Phosphate and Fibroblast Growth Factor 23 Reduction in CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(10):2328-2339. doi:10.1681/asn.2015020117
79. Kovesdy CP, Quarles LD. Fibroblast growth factor-23: what we know, what we don't know, and what we need to know. *Nephrol Dial Transpl.* 2013;28(9):2228-2236. doi:10.1093/ndt/gft065
80. Hruska KA, Seifert M, Sugatani T, et al. Forging forward with 10 burning questions on FGF23 in kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2015;10(7):1125-1135. doi:10.1681/ASN.2007010068
81. Berndt T, Thomas LF, Craig TA, et al. Evidence for a signaling axis by which intestinal phosphate rapidly modulates renal phosphate reabsorption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(26):11085-11090. doi:10.1073/pnas.0704446104
82. Canalejo R, Canalejo A, Martinez-Moreno JM, et al. FGF23 fails to inhibit uremic parathyroid glands. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(7):1125-1135. doi:10.1681/ASN.2009040427
83. Fukuda N, Tanaka H, Tominaga Y, Fukagawa M, Kurokawa K, Seino Y. Decreased 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor density is associated with a more severe form of parathyroid hyperplasia in chronic uremic patients. *J Clin Invest.* 1993;92(3):1436-1443. doi:10.1172/JCI116720
84. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature.* 1993;366(6455):575-580. doi:10.1038/366575a0
85. Block GA, Martin KJ, de Francisco AL, et al. Cinacalcet for secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med.* 2004;350(15):1516-1525. doi:10.1056/NEJMoa031633
86. Sprague SM, Wetmore JB, Gurevich K, et al. Cinacalcet treatment and serum FGF23 levels in haemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transpl.* 2012;32(2):1447-1449. doi:10.1093/ndt/gfr384
87. Yano S, Sugimoto T, Kanzawa M, et al. Association of polymorphic alleles of the calcium-sensing receptor gene with parathyroid hormone secretion in hemodialysis patients. *Nephron.* 2000;85(4):317-323. doi:10.1159/000045681
88. Grzegorzewska AE, Paciorkowski M, Mostowska A, et al. Associations of the calcium-sensing receptor gene CASR rs7652589 SNP with nephrolithiasis and secondary hyperparathyroidism in haemodialysis patients. *Sci Rep.*

2016;6(1):35188. doi:10.1038/srep35188

89. Grzegorzewska AE, Świdarska MK, Mostowska A, Warchoń W, Jagodziński PP. Polymorphisms of Vitamin D Signaling Pathway Genes and Calcium-Sensing Receptor Gene in respect to Survival of Hemodialysis Patients: A Prospective Observational Study. *Int J Endocrinol.* 2016;2016:2383216. doi:10.1155/2016/2383216
90. Canaff L, Hendy GN. Human calcium-sensing receptor gene. Vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Biol Chem.* 2002;277(33):30337-30350. doi:10.1074/jbc.M201804200
91. Ritter CS, Finch JL, Slatopolsky EA, Brown AJ. Parathyroid hyperplasia in uremic rats precedes down-regulation of the calcium receptor. *Kidney Int.* 2001;60(5):1737-1744. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00027.x
92. Ritter C, Miller B, Coyne DW, et al. Paricalcitol and cinacalcet have disparate actions on parathyroid oxyphil cell content in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2017;92(5):1217-1222. doi:10.1016/j.kint.2017.05.003
93. Breitwieser GE. Pharmacoperones and the calcium sensing receptor: exogenous and endogenous regulators. *Pharmacol Res.* 2014;83:30-37. doi:10.1016/j.phrs.2013.11.006
94. Naveh-Manny T, Rahamimov R, Livni N, Silver J. Parathyroid cell proliferation in normal and chronic renal failure rats. The effects of calcium, phosphate, and vitamin D. *J Clin Invest.* 1995;96(4):1786-1793. doi:10.1172/JCI118224
95. Zhang MYH, Wang X, Wang JT, et al. Dietary phosphorus transcriptionally regulates 25-hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -hydroxylase gene expression in the proximal renal tubule. *Endocrinology.* 2002;143(2):587-595. doi:10.1210/endo.143.2.8627
96. Potts JT. Parathyroid hormone: past and present. *J Endocrinol.* 2005;187(3):311-325. doi:10.1677/joe.1.06057
97. Pacifici R. T cells: critical bone regulators in health and disease. *Bone.* 2010;47(3):461-471. doi:10.1016/j.bone.2010.04.611
98. Reid IR. Short-term and long-term effects of osteoporosis therapies. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(7):418-428. doi:10.1038/nrendo.2015.71
99. Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, et al. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(2):520-528. doi:10.1681/ASN.2004070602
100. Tentori F, Blayney MJ, Albert JM, et al. Mortality risk for dialysis patients with different levels of serum calcium, phosphorus, and PTH: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am J Kidney Dis.* 2008;52(3):519-530. doi:10.1053/j.ajkd.2008.03.020

101. Slatopolsky E, Finch J, Denda M, et al. Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth. High phosphorus directly stimulates PTH secretion in vitro. *J Clin Invest.* 1996;97(11):2534-2540. doi:10.1172/JCI118701
102. Almaden Y, Canalejo A, Hernandez A, et al. Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro. *J Bone Min Res.* 1996;11(7):970-976. doi:10.1002/jbmr.5650110714
103. de Francisco AL, Cobo MA, Setien MA, et al. Effect of serum phosphate on parathyroid hormone secretion during hemodialysis. *Kidney Int.* 1998;54(6):2140-2145. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00221.x
104. Slatopolsky E, Caglar S, Pennell JP, et al. On the pathogenesis of hyperparathyroidism in chronic experimental renal insufficiency in the dog. *J Clin Invest.* 1971;50(3):492-499. doi:10.1172/JCI106517
105. Denda M, Finch J, Slatopolsky E. Phosphorus accelerates the development of parathyroid hyperplasia and secondary hyperparathyroidism in rats with renal failure. *Am J Kidney Dis.* 1996;28(4):596-602. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8840952>. Accessed November 20, 2018.
106. Rodriguez M, Felsenfeld AJ. PTH, FGF-23 and early CKD. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(11):3391-3393. doi:10.1093/ndt/gfn438
107. Kremer R, Bolivar I, Goltzman D, Hendy GN. Influence of calcium and 1,25-dihydroxycholecalciferol on proliferation and proto-oncogene expression in primary cultures of bovine parathyroid cells. *Endocrinology.* 1989;125(2):935-941. doi:10.1210/endo-125-2-935
108. Cozzolino M, Lu Y, Finch J, Slatopolsky E, Dusso AS. p21WAF1 and TGF- $\alpha$  mediate parathyroid growth arrest by vitamin D and high calcium. *Kidney Int.* 2001;60(6):2109-2117. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00042.x
109. Duranton F, Rodriguez-Ortiz ME, Duny Y, Rodriguez M, Daurès J-P, Argilés A. Vitamin D Treatment and Mortality in Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Nephrol.* 2013;37(3):239-248. doi:10.1159/000346846
110. Rodriguez M, Canalejo A, Garfia B, Aguilera E, Almaden Y. Pathogenesis of refractory secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int Suppl.* 2002;61(80):155-160. doi:10.1046/j.1523-1755.61.s80.26.x
111. Patel SR, Ke HQ, Vanholder R, Koenig RJ, Hsu CH. Inhibition of calcitriol receptor binding to vitamin D response elements by uremic toxins. *J Clin Invest.* 1995;96(1):50-59. doi:10.1172/JCI118061
112. Nagaba Y, Heishi M, Tazawa H, Tsukamoto Y, Kobayashi Y. Vitamin D receptor gene polymorphisms affect secondary hyperparathyroidism in hemodialyzed patients. *Am J Kidney Dis.* 1998;32(3):464-469. doi:10.1053/ajkd.1998.v32.pm9740163
113. Marco MP, Martínez I, Betriu A, Craver L, Fibla MJ, Fernández E. Influence of

- BsmI vitamin D receptor gene polymorphism on the response to a single bolus of calcitriol in hemodialysis patients. *Clin Nephrol.* 2001;56(2):111-116. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11522087>. Accessed November 21, 2018.
114. Testa A, Mallamaci F, Benedetto FA, et al. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism is associated with left ventricular (LV) mass and predicts left ventricular hypertrophy (LVH) progression in end-stage renal disease (ESRD) patients. *J Bone Miner Res.* 2010;25(2):313-319. doi:10.1359/jbmr.090717
  115. El-Shehaby AM, El-Khatib MM, Marzouk S, Battah AA. Relationship of BsmI polymorphism of vitamin D receptor gene with left ventricular hypertrophy and atherosclerosis in hemodialysis patients. *Scand J Clin Lab Invest.* 2013;73(1):75-81. doi:10.3109/00365513.2012.743163
  116. Yokoyama K, Nakashima A, Urashima M, et al. Interactions between serum vitamin D levels and vitamin D receptor gene FokI polymorphisms for renal function in patients with type 2 diabetes. Abe H, ed. *PLoS One.* 2012;7(12):e51171. doi:10.1371/journal.pone.0051171
  117. Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren O, Jüppner H, Jonsson KB. Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney Int.* 2003;64(6):2272-2279. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00328.x
  118. Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S, et al. Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280(4):1015-1020. doi:10.1006/bbrc.2000.4226
  119. Galitzer H, Ben-Dov IZ, Silver J, Naveh-Many T. Parathyroid cell resistance to fibroblast growth factor 23 in secondary hyperparathyroidism of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2010;77(3):211-218. doi:10.1038/ki.2009.464
  120. Komaba H, Goto S, Fujii H, et al. Depressed expression of Klotho and FGF receptor 1 in hyperplastic parathyroid glands from uremic patients. *Kidney Int.* 2010;77(3):232-238. doi:10.1038/ki.2009.414
  121. Román-García P, Carrillo-López N, Naves-Díaz M, Rodríguez I, Ortiz A, Cannata-Andía JB. Dual-specificity phosphatases are implicated in severe hyperplasia and lack of response to FGF23 of uremic parathyroid glands from rats. *Endocrinology.* 2012;153(4):1627-1637. doi:10.1210/en.2011-1770
  122. Mizobuchi M, Ogata H, Koiwa F. Secondary hyperparathyroidism: Pathogenesis and latest treatment. *Ther Apher Dial.* November 2018. doi:10.1111/1744-9987.12772
  123. Olauson H, Lindberg K, Amin R, et al. Parathyroid-specific deletion of Klotho unravels a novel calcineurin-dependent FGF23 signaling pathway that regulates PTH secretion. Carpenter TO, ed. *PLoS Genet.* 2013;9(12):e1003975. doi:10.1371/journal.pgen.1003975
  124. Kawakami K, Takeshita A, Furushima K, et al. Persistent fibroblast growth factor

- 23 signalling in the parathyroid glands for secondary hyperparathyroidism in mice with chronic kidney disease. *Sci Rep*. 2017;7(1):40534. doi:10.1038/srep40534
125. Isakova T, Block G. The phosphate bucket list. *Kidney Int*. 2018;93(5):1033-1035. doi:10.1016/j.kint.2018.01.010
  126. Zoccali C, London G. Con: vascular calcification is a surrogate marker, but not the cause of ongoing vascular disease, and it is not a treatment target in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(3):352-357. doi:10.1093/ndt/gfv021
  127. Vervloet MG, Massy ZA, Brandenburg VM, et al. Bone: a new endocrine organ at the heart of chronic kidney disease and mineral and bone disorders. *lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(5):427-436. doi:10.1016/S2213-8587(14)70059-2
  128. Amann K. Media calcification and intima calcification are distinct entities in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(6):1599-1605. doi:10.2215/CJN.02120508
  129. Brandenburg V, Adragao T, van Dam B, et al. Blueprint for a European calciphylaxis registry initiative: the European Calciphylaxis Network (EuCalNet). *Clin Kidney J*. 2015;8(5):567-571. doi:10.1093/ckj/sfv056
  130. Drüeke TB. Cell biology of parathyroid gland hyperplasia in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(6):1141-1152. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10820180>. Accessed November 21, 2018.
  131. Moe SM, Chen NX. Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ Res*. 2004;95(6):560-567. doi:10.1161/01.RES.0000141775.67189.98
  132. Moe SM, Chen NX. Mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(2):213-216. doi:10.1681/ASN.2007080854
  133. Ketteler M. Fetuin-A and extraosseous calcification in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14(4):337-342. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15931001>. Accessed November 21, 2018.
  134. Bell NH, Greene A, Epstein S, Oexmann MJ, Shaw S, Shary J. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in blacks. *J Clin Invest*. 1985;76(2):470-473. doi:10.1172/JCI111995
  135. Gutiérrez OM, Isakova T, Andress DL, Levin A, Wolf M. Prevalence and severity of disordered mineral metabolism in Blacks with chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2008;73(8):956-962. doi:10.1038/ki.2008.4
  136. Jono S, McKee MD, Murry CE, et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res*. 2000;87(7):E10-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11009570>. Accessed November 23, 2018.
  137. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, et al. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med*. 2000;342(20):1478-1483. doi:10.1056/NEJM200005183422003



138. Raggi P, Chertow GM, Torres PU, et al. The ADVANCE study: a randomized study to evaluate the effects of cinacalcet plus low-dose vitamin D on vascular calcification in patients on hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(4):1327-1339. doi:10.1093/ndt/gfq725
139. Chertow GM, Block GA, Correa-Rotter R, et al. Effect of cinacalcet on cardiovascular disease in patients undergoing dialysis. *N Engl J Med*. 2012;367(26):2482-2494. doi:10.1056/NEJMoa1205624
140. Bover J, Ureña P, Ruiz-García C, et al. Clinical and Practical Use of Calcimimetics in Dialysis Patients With Secondary Hyperparathyroidism. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11(1):161-174. doi:10.2215/CJN.01760215
141. Yamada S, Tokumoto M, Tatsumoto N, et al. Phosphate overload directly induces systemic inflammation and malnutrition as well as vascular calcification in uremia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;306(12):F1418-28. doi:10.1152/ajprenal.00633.2013
142. Stenvinkel P. Endothelial dysfunction and inflammation-is there a link? *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(10):1968-1971. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11572879>. Accessed October 19, 2018.
143. Stenvinkel P. Interactions between inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction in end-stage renal disease. *J Ren Nutr*. 2003;13(2):144-148. doi:10.1053/jren.2003.50018
144. Zoccali C. Traditional and emerging cardiovascular and renal risk factors: an epidemiologic perspective. *Kidney Int*. 2006;70(1):26-33. doi:10.1038/sj.ki.5000417
145. Ellam TJ, Chico TJA. Phosphate: the new cholesterol? The role of the phosphate axis in non-uremic vascular disease. *Atherosclerosis*. 2012;220(2):310-318. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.002
146. Martínez-Moreno JM, Muñoz-Castañeda JR, Herencia C, et al. In vascular smooth muscle cells paricalcitol prevents phosphate-induced Wnt/ $\beta$ -catenin activation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(8):F1136-44. doi:10.1152/ajprenal.00684.2011
147. Ariza F, Merino A, Carracedo J, et al. Post-dilution high convective transport improves microinflammation and endothelial dysfunction independently of the technique. *Blood Purif*. 2013;35(4):270-278. doi:10.1159/000350611
148. Górriz JL, Molina P, Cerverón MJ, et al. Vascular calcification in patients with nondialysis CKD over 3 years. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(4):654-666. doi:10.2215/CJN.07450714
149. Nakamura S, Ishibashi-Ueda H, Niizuma S, Yoshihara F, Horio T, Kawano Y. Coronary calcification in patients with chronic kidney disease and coronary artery disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(12):1892-1900. doi:10.2215/CJN.04320709
150. Bover J, Górriz JL, Ureña-Torres P, et al. Detection of cardiovascular

- calcifications: Is it a useful tool for nephrologists? *Nefrologia*. 2016;36(6):587-596. doi:10.1016/j.nefro.2016.05.021
151. Stenvinkel P. Inflammatory and atherosclerotic interactions in the depleted uremic patient. *Blood Purif*. 2001;19(1):53-61. doi:10.1159/000014479
  152. Seras M, Martín de Francisco ÁL, Piñera C, et al. Haemodialysis session: the perfect storm for vascular calcification. *Nefrologia*. 2015;35(5):448-456. doi:10.1016/j.nefro.2015.06.015
  153. Cai MMX, Smith ER, Holt SG. The role of fetuin-A in mineral trafficking and deposition. *Bonekey Rep*. 2015;4:672. doi:10.1038/bonekey.2015.39
  154. Morena M, Jaussent I, Dupuy A-M, et al. Osteoprotegerin and sclerostin in chronic kidney disease prior to dialysis: potential partners in vascular calcifications. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(8):1345-1356. doi:10.1093/ndt/gfv081
  155. Luo G, Ducy P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*. 1997;386(6620):78-81. doi:10.1038/386078a0
  156. Rodelo-Haad C, De La Puebla Gimenez RF, Ortega R, Rodriguez M, Aljama P. Calcific arteriopathy beyond chronic kidney disease. The role of hemochromatosis and Vitamin K antagonists. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2018;15(1). doi:10.11138/ccmbm/2017.15.1.085
  157. ADHR Consortium KE, Evans WE, O’Riordan JLH, et al. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet*. 2000;26(3):345-348. doi:10.1038/81664
  158. Shimada T, Mizutani S, Muto T, et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(11):6500-6505. doi:10.1073/pnas.101545198
  159. Itoh N, Ohta H, Konishi M. Endocrine FGFs: Evolution, Physiology, Pathophysiology, and Pharmacotherapy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:154. doi:10.3389/fendo.2015.00154
  160. Martin A, David V, Quarles LD. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiol Rev*. 2012;92(1):131-155. doi:10.1152/physrev.00002.2011
  161. Itoh N, Ornitz DM. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet*. 2004;20(11):563-569. doi:10.1016/j.tig.2004.08.007
  162. Itoh N. Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Res*. 2010;342(1):1-11. doi:10.1007/s00441-010-1024-2
  163. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2015;4(3):215-266. doi:10.1002/wdev.176
  164. Fukumoto S. Actions and mode of actions of FGF19 subfamily members. *Endocr*

- J.* 2008;55(1):23-31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17878606>. Accessed November 26, 2018.
165. Johnson K, Levine K, Sergi J, et al. Therapeutic Effects of FGF23 c-tail Fc in a Murine Preclinical Model of X-Linked Hypophosphatemia Via the Selective Modulation of Phosphate Reabsorption. *J Bone Miner Res.* 2017;32(10):2062-2073. doi:10.1002/jbmr.3197
  166. Goetz R, Beenken A, Ibrahimi OA, et al. Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Mol Cell Biol.* 2007;27(9):3417-3428. doi:10.1128/MCB.02249-06
  167. Wolf M. Forging Forward with 10 Burning Questions on FGF23 in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(9):1427-1435. doi:10.1681/ASN.2009121293
  168. Gattineni J, Bates C, Twombly K, et al. FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;297(2):F282-91. doi:10.1152/ajprenal.90742.2008
  169. Li H, Martin A, David V, Quarles LD. Compound deletion of Fgfr3 and Fgfr4 partially rescues the Hyp mouse phenotype. *Am J Physiol Metab.* 2011;300(3):E508-E517. doi:10.1152/ajpendo.00499.2010
  170. Erben RG. Physiological Actions of Fibroblast Growth Factor-23. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:267. doi:10.3389/fendo.2018.00267
  171. Richter B, Faul C. FGF23 Actions on Target Tissues-With and Without Klotho. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:189. doi:10.3389/fendo.2018.00189
  172. Grabner A, Amaral AP, Schramm K, et al. Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. *Cell Metab.* 2015;22(6):1020-1032. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.002
  173. Li S-A, Watanabe M, Yamada H, Nagai A, Kinuta M, Takei K. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. *Cell Struct Funct.* 2004;29(4):91-99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15665504>. Accessed November 27, 2018.
  174. Takeshita K, Fujimori T, Kurotaki Y, et al. Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression. *Circulation.* 2004;109(14):1776-1782. doi:10.1161/01.CIR.0000124224.48962.32
  175. Kuro-O M. The Klotho proteins in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 15(1):27-44. doi:10.1038/s41581-018-0078-3
  176. Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating  $\alpha$ Klotho. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(1):79-90. doi:10.1681/ASN.2014101030
  177. Cha S-K, Ortega B, Kurosu H, Rosenblatt KP, Kuro-O M, Huang C-L. Removal

- of sialic acid involving Klotho causes cell-surface retention of TRPV5 channel via binding to galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(28):9805-9810. doi:10.1073/pnas.0803223105
178. Lu P, Boros S, Chang Q, Bindels RJ, Hoenderop JG. The beta-glucuronidase klotho exclusively activates the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(11):3397-3402. doi:10.1093/ndt/gfn291
  179. Liu S, Tang W, Zhou J, et al. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(5):1305-1315. doi:10.1681/asn.2005111185
  180. Inoue Y, Segawa H, Kaneko I, et al. Role of the vitamin D receptor in FGF23 action on phosphate metabolism. *Biochem J*. 2005;390(Pt 1):325-331. doi:10.1042/BJ20041799
  181. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res*. 2004;19(3):429-435. doi:10.1359/JBMR.0301264
  182. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast Growth Factor 23 and Klotho: Physiology and Pathophysiology of an Endocrine Network of Mineral Metabolism. *Annu Rev Physiol*. 2013;75(1):503-533. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183727
  183. Faul C. FGF23 effects on the heart-levels, time, source, and context matter. *Kidney Int*. 2018;94(1):7-11. doi:10.1016/j.kint.2018.03.024
  184. Di Marco GS, Reuter S, Kentrup D, et al. Cardioprotective effect of calcineurin inhibition in an animal model of renal disease. *Eur Heart J*. 2011;32(15):1935-1945. doi:10.1093/eurheartj/ehq436
  185. Hu MC, Shi M, Cho HJ, et al. Klotho and phosphate are modulators of pathologic uremic cardiac remodeling. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(6):1290-1302. doi:10.1681/ASN.2014050465
  186. Xie J, Yoon J, An S-W, Kuro-o M, Huang C-L. Soluble Klotho Protects against Uremic Cardiomyopathy Independently of Fibroblast Growth Factor 23 and Phosphate. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(5):1150-1160. doi:10.1681/ASN.2014040325
  187. Neuburg S, Dussold C, Gerber C, et al. Genetic background influences cardiac phenotype in murine chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(7):1129-1137. doi:10.1093/ndt/gfx332
  188. Leifheit-Nestler M, Grosse Siemer R, Flasbart K, et al. Induction of cardiac FGF23/FGFR4 expression is associated with left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transpl*. 2016;31(7):1088-1099. doi:10.1093/ndt/gfv421
  189. Matsui I, Oka T, Kusunoki Y, et al. Cardiac hypertrophy elevates serum levels of fibroblast growth factor 23. *Kidney Int*. 2018;94(1):60-71.

doi:10.1016/j.kint.2018.02.018

190. Leifheit-Nestler M, Kirchhoff F, Nespor J, et al. Fibroblast growth factor 23 is induced by an activated renin-angiotensin-aldosterone system in cardiac myocytes and promotes the pro-fibrotic crosstalk between cardiac myocytes and fibroblasts. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(10):1722-1734. doi:10.1093/ndt/gfy006
191. Huang S-Y, Chen Y-C, Kao Y-H, et al. Fibroblast growth factor 23 dysregulates late sodium current and calcium homeostasis with enhanced arrhythmogenesis in pulmonary vein cardiomyocytes. *Oncotarget*. 2016;7(43):69231-69242. doi:10.18632/oncotarget.12470
192. Pastor-Arroyo E-M, Gehring N, Krudewig C, et al. The elevation of circulating fibroblast growth factor 23 without kidney disease does not increase cardiovascular disease risk. *Kidney Int*. 2018;94(1):49-59. doi:10.1016/j.kint.2018.02.017
193. Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, et al. Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol*. 2010;24(10):2050-2064. doi:10.1210/me.2010-0142
194. Grabner A, Schramm K, Silswal N, et al. FGF23/FGFR4-mediated left ventricular hypertrophy is reversible. *Sci Rep*. 2017;7(1):1993. doi:10.1038/s41598-017-02068-6
195. Han X, Li L, Yang J, King G, Xiao Z, Quarles LD. Counter-regulatory paracrine actions of FGF-23 and 1,25(OH)<sub>2</sub>D in macrophages. Ellmeier W, ed. *FEBS Lett*. 2016;590(1):53-67. doi:10.1002/1873-3468.12040
196. Cohen G, Haag-Weber M, Hörl WH. Immune dysfunction in uremia. *Kidney Int Suppl*. 1997;62:S79-82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9350688>. Accessed December 2, 2018.
197. Chonchol M, Greene T, Zhang Y, Hoofnagle AN, Cheung AK. Low Vitamin D and High Fibroblast Growth Factor 23 Serum Levels Associate with Infectious and Cardiac Deaths in the HEMO Study. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(1):227-237. doi:10.1681/asn.2014101009
198. Souza ACP, Yuen PST, Star RA. Microparticles: markers and mediators of sepsis-induced microvascular dysfunction, immunosuppression, and AKI. *Kidney Int*. 2015;87(6):1100-1108. doi:10.1038/ki.2015.26
199. Dalrymple LS, Go AS. Epidemiology of acute infections among patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(5):1487-1493. doi:10.2215/CJN.01290308
200. Anding K, Gross P, Rost JM, Allgaier D, Jacobs E. The influence of uraemia and haemodialysis on neutrophil phagocytosis and antimicrobial killing. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(10):2067-2073. doi:10.1093/ndt/gfg330
201. Rossaint J, Spelten O, Kässens N, et al. Acute loss of renal function attenuates slow leukocyte rolling and transmigration by interfering with intracellular signaling.

- Kidney Int.* 2011;80(5):493-503. doi:10.1038/ki.2011.125
202. Wallquist C, Mansouri L, Norrbäck M, et al. Associations of Fibroblast Growth Factor 23 with Markers of Inflammation and Leukocyte Transmigration in Chronic Kidney Disease. *Nephron*. 2018;138(4):287-295. doi:10.1159/000485472
  203. Yang K, Peretz-Soroka H, Wu J, et al. Fibroblast growth factor 23 weakens chemotaxis of human blood neutrophils in microfluidic devices. *Sci Rep*. 2017;7(1):3100. doi:10.1038/s41598-017-03210-0
  204. Haddad LE, Khzam LB, Hajjar F, Merhi Y, Sirois MG. Characterization of FGF receptor expression in human neutrophils and their contribution to chemotaxis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;301(5):C1036-45. doi:10.1152/ajpcell.00215.2011
  205. Bacchetta J, Sea JL, Chun RF, et al. Fibroblast growth factor 23 inhibits extrarenal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D in human monocytes. *J Bone Miner Res*. 2013;28(1):46-55. doi:10.1002/jbmr.1740
  206. Murali SK, Roschger P, Zeitz U, Klaushofer K, Andrukhova O, Erben RG. FGF23 Regulates Bone Mineralization in a 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> and Klotho-Independent Manner. *J Bone Miner Res*. 2016;31(1):129-142. doi:10.1002/jbmr.2606
  207. Addison WN, Azari F, Sørensen ES, Kaartinen MT, McKee MD. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Biol Chem*. 2007;282(21):15872-15883. doi:10.1074/jbc.M701116200
  208. Shalhoub V, Ward SC, Sun B, et al. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) and alpha-klotho stimulate osteoblastic MC3T3.E1 cell proliferation and inhibit mineralization. *Calcif Tissue Int*. 2011;89(2):140-150. doi:10.1007/s00223-011-9501-5
  209. Komaba H, Kaludjerovic J, Hu DZ, et al. Klotho expression in osteocytes regulates bone metabolism and controls bone formation. *Kidney Int*. 2017;92(3):599-611. doi:10.1016/j.kint.2017.02.014
  210. Pereira RC, Salusky IB, Roschger P, et al. Impaired osteocyte maturation in the pathogenesis of renal osteodystrophy. *Kidney Int*. 2018;94(5):1002-1012. doi:10.1016/j.kint.2018.08.011
  211. Agoro R, Montagna A, Goetz R, et al. Inhibition of fibroblast growth factor 23 (FGF23) signaling rescues renal anemia. *FASEB J*. 2018;32(7):3752-3764. doi:10.1096/fj.201700667R
  212. Coe LM, Madathil SV, Casu C, Lanske B, Rivella S, Sitara D. FGF-23 is a negative regulator of prenatal and postnatal erythropoiesis. *J Biol Chem*. 2014;289(14):9795-9810. doi:10.1074/jbc.M113.527150
  213. Hanudel MR, Laster M, Salusky IB. Non-renal-Related Mechanisms of FGF23 Pathophysiology. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(6):724-729. doi:10.1007/s11914-018-0492-2

214. Mehta R, Cai X, Hodakowski A, et al. Fibroblast Growth Factor 23 and Anemia in the Chronic Renal Insufficiency Cohort Study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(11):1795-1803. doi:10.2215/CJN.03950417
215. Nakatani T, Sarraj B, Ohnishi M, et al. In vivo genetic evidence for klotho-dependent, fibroblast growth factor 23 (Fgf23) -mediated regulation of systemic phosphate homeostasis. *FASEB J*. 2009;23(2):433-441. doi:10.1096/fj.08-114397
216. Hensel N, Schön A, Konen T, et al. Fibroblast growth factor 23 signaling in hippocampal cells: impact on neuronal morphology and synaptic density. *J Neurochem*. 2016;137(5):756-769. doi:10.1111/jnc.13585
217. Wang XH, Mitch WE. Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(9):504-516. doi:10.1038/nrneph.2014.112
218. Aono Y, Hasegawa H, Yamazaki Y, et al. Anti-FGF-23 neutralizing antibodies ameliorate muscle weakness and decreased spontaneous movement of Hyp mice. *J Bone Miner Res*. 2011;26(4):803-810. doi:10.1002/jbmr.275
219. Zhao P, Caretti G, Mitchell S, et al. Fgfr4 is required for effective muscle regeneration in vivo. Delineation of a MyoD-Tead2-Fgfr4 transcriptional pathway. *J Biol Chem*. 2006;281(1):429-438. doi:10.1074/jbc.M507440200
220. VI JGT, Cheuk AT, Tsang PS, et al. Identification of FGFR4-activating mutations in human rhabdomyosarcomas that promote metastasis in xenotransplanted models. *J Clin Invest*. October 2009. doi:10.1172/JCI39703
221. Krick S, Baumlin N, Aller SP, et al. Klotho Inhibits Interleukin-8 Secretion from Cystic Fibrosis Airway Epithelia. *Sci Rep*. 2017;7(1):14388. doi:10.1038/s41598-017-14811-0
222. Richter B, Haller J, Haffner D, Leifheit-Nestler M. Klotho modulates FGF23-mediated NO synthesis and oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Pflugers Arch*. 2016;468(9):1621-1635. doi:10.1007/s00424-016-1858-x
223. Stevens KK, McQuarrie EP, Sands W, et al. Fibroblast growth factor 23 predicts left ventricular mass and induces cell adhesion molecule formation. *Int J Nephrol*. 2011;2011:297070. doi:10.4061/2011/297070
224. Buendía P, Carracedo J, Soriano S, et al. Klotho Prevents NFκB Translocation and Protects Endothelial Cell From Senescence Induced by Uremia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015;70(10):1198-1209. doi:10.1093/gerona/glu170
225. Scialla JJ, Lau WL, Reilly MP, et al. Fibroblast growth factor 23 is not associated with and does not induce arterial calcification. *Kidney Int*. 2013;83(6):1159-1168. doi:10.1038/ki.2013.3
226. Saji F, Shigematsu T, Sakaguchi T, et al. Fibroblast growth factor 23 production in bone is directly regulated by 1{alpha},25-dihydroxyvitamin D, but not PTH. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;299(5):F1212-7. doi:10.1152/ajprenal.00169.2010
227. Nguyen-Yamamoto L, Karaplis AC, St-Arnaud R, Goltzman D. Fibroblast Growth

- Factor 23 Regulation by Systemic and Local Osteoblast-Synthesized 1,25-Dihydroxyvitamin D. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(2):586-597. doi:10.1681/ASN.2016010066
228. Chande S, Bergwitz C. Role of phosphate sensing in bone and mineral metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(11):637-655. doi:10.1038/s41574-018-0076-3
  229. Bergwitz C, Rasmussen MD, DeRobertis C, et al. Roles of major facilitator superfamily transporters in phosphate response in Drosophila. Singh SR, ed. *PLoS One.* 2012;7(2):e31730. doi:10.1371/journal.pone.0031730
  230. Perwad F, Azam N, Zhang MYH, Yamashita T, Tenenhouse HS, Portale AA. Dietary and serum phosphorus regulate fibroblast growth factor 23 expression and 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in mice. *Endocrinology.* 2005;146(12):5358-5364. doi:10.1210/en.2005-0777
  231. Ferrari SL, Bonjour J-P, Rizzoli R. Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(3):1519-1524. doi:10.1210/jc.2004-1039
  232. Nishida Y, Taketani Y, Yamanaka-Okumura H, et al. Acute effect of oral phosphate loading on serum fibroblast growth factor 23 levels in healthy men. *Kidney Int.* 2006;70(12):2141-2147. doi:10.1038/sj.ki.5002000
  233. Vervloet MG, van Ittersum FJ, Büttler RM, Heijboer AC, Blankenstein MA, ter Wee PM. Effects of dietary phosphate and calcium intake on fibroblast growth factor-23. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(2):383-389. doi:10.2215/CJN.04730510
  234. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2011;79(12):1370-1378. doi:10.1038/ki.2011.47
  235. Urena Torres P, Friedlander G, de Vernejoul MC, Silve C, Prie D. Bone mass does not correlate with the serum fibroblast growth factor 23 in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2008;73(1):102-107. doi:10.1038/sj.ki.5002622
  236. Brandenburg VM, Schlieper G, Heussen N, et al. Serological cardiovascular and mortality risk predictors in dialysis patients receiving sevelamer: a prospective study. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(8):2672-2679. doi:10.1093/ndt/gfq053
  237. Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C, Muros M, Herrera H, Garcia J. Mineral metabolism and inflammation in chronic kidney disease patients: a cross-sectional study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(10):1646-1654. doi:10.2215/CJN.02420409
  238. Lopez I, Rodriguez-Ortiz ME, Almaden Y, et al. Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Kidney Int.* 2011;80(5):475-482. doi:10.1038/ki.2011.107
  239. Tetradis S, Bezouglaia O, Tsingotjidou A. Parathyroid hormone induces expression of the nuclear orphan receptor Nurr1 in bone cells. *Endocrinology.* 2001;142(2):663-670. doi:10.1210/endo.142.2.7926



240. Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, et al. Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(5):F1088-95. doi:10.1152/ajprenal.00474.2004
241. Gravesen E, Mace ML, Hofman-Bang J, Olgaard K, Lewin E. Circulating FGF23 levels in response to acute changes in plasma Ca(2+). *Calcif Tissue Int*. 2014;95(1):46-53. doi:10.1007/s00223-014-9861-8
242. David V, Dai B, Martin A, Huang J, Han X, Quarles LD. Calcium regulates FGF-23 expression in bone. *Endocrinology*. 2013;154(12):4469-4482. doi:10.1210/en.2013-1627
243. Quinn SJ, Thomsen AR, Pang JL, et al. Interactions between calcium and phosphorus in the regulation of the production of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;304(3):E310-20. doi:10.1152/ajpendo.00460.2012
244. di Giuseppe R, Kuhn T, Hirche F, et al. Potential Predictors of Plasma Fibroblast Growth Factor 23 Concentrations: Cross-Sectional Analysis in the EPIC-Germany Study. *PLoS One*. 2015;10(7):e0133580. doi:10.1371/journal.pone.0133580
245. Hardy R, Cooper MS. Bone loss in inflammatory disorders. *J Endocrinol*. 2009;201(3):309-320. doi:10.1677/JOE-08-0568
246. Bischoff SC, Herrmann A, Göke M, Manns MP, von zur Mühlen A, Brabant G. Altered bone metabolism in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 1997;92(7):1157-1163. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9219790>. Accessed October 19, 2018.
247. Gough A, Sambrook P, Devlin J, et al. Osteoclastic activation is the principal mechanism leading to secondary osteoporosis in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1998;25(7):1282-1289. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9676757>. Accessed October 19, 2018.
248. Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C, Muros de Fuentes M, Donate-Correa J, Cazana-Perez V, Garcia-Perez J. Effect of phosphate binders on serum inflammatory profile, soluble CD14, and endotoxin levels in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(9):2272-2279. doi:10.2215/CJN.01650211
249. Ortiz A, Covic A, Fliser D, et al. Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure. *Lancet (London, England)*. 2014;383(9931):1831-1843. doi:10.1016/S0140-6736(14)60384-6
250. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 1999;55(2):648-658. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00273.x
251. Munoz Mendoza J, Isakova T, Ricardo AC, et al. Fibroblast growth factor 23 and Inflammation in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7(7):1155-1162. doi:10.2215/cjn.13281211
252. Dounousi E, Torino C, Pizzini P, et al. Intact FGF23 and alpha-Klotho during acute

- inflammation/sepsis in CKD patients. *Eur J Clin Invest*. 2016;46(3):234-241. doi:10.1111/eci.12588
253. Han X, Xiao Z, Quarles LD. Membrane and integrative nuclear fibroblastic growth factor receptor (FGFR) regulation of FGF-23. *J Biol Chem*. 2015;290(16):10447-10459. doi:10.1074/jbc.M114.609230
  254. Wolf M, Koch TA, Bregman DB. Effects of iron deficiency anemia and its treatment on fibroblast growth factor 23 and phosphate homeostasis in women. *J Bone Miner Res*. 2013;28(8):1793-1803. doi:10.1002/jbmr.1923
  255. Toro L, Barrientos V, León P, et al. Erythropoietin induces bone marrow and plasma fibroblast growth factor 23 during acute kidney injury. *Kidney Int*. 2018;93(5):1131-1141. doi:10.1016/j.kint.2017.11.018
  256. Rabadi S, Udo I, Leaf DE, Waikar SS, Christov M. Acute blood loss stimulates fibroblast growth factor 23 production. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018;314(1):F132-F139. doi:10.1152/ajprenal.00081.2017
  257. Hanudel MR, Eisenga MF, Rappaport M, et al. Effects of erythropoietin on fibroblast growth factor 23 in mice and humans. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;gfy189. doi:10.1093/ndt/gfy189
  258. Cammisotto PG, Londono I, Gingras D, Bendayan M. Control of glycogen synthase through ADIPOR1-AMPK pathway in renal distal tubules of normal and diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294(4):F881-9. doi:10.1152/ajprenal.00373.2007
  259. Rutkowski JM, Pastor J, Sun K, et al. Adiponectin alters renal calcium and phosphate excretion through regulation of klotho expression. *Kidney Int*. 2017;91(2):324-337. doi:10.1016/j.kint.2016.09.016
  260. Hanks LJ, Casazza K, Judd SE, Jenny NS, Gutiérrez OM. Associations of Fibroblast Growth Factor-23 with Markers of Inflammation, Insulin Resistance and Obesity in Adults. Sanchez-Margalet V, ed. *PLoS One*. 2015;10(3):e0122885. doi:10.1371/journal.pone.0122885
  261. Reyes-Garcia R, Garcia-Martín A, García-Fontana B, Morales-Santana S, Rozas-Moreno P, Muñoz-Torres M. FGF23 in type 2 diabetic patients: relationship with bone metabolism and vascular disease. *Diabetes Care*. 2014;37(5):e89-90. doi:10.2337/dc13-2235
  262. Bär L, Feger M, Fajol A, et al. Insulin suppresses the production of fibroblast growth factor 23 (FGF23). *Proc Natl Acad Sci*. 2018;115(22):5804-5809. doi:10.1073/pnas.1800160115
  263. Ursem SR, Vervloet MG, Büttler RM, et al. The interrelation between FGF23 and glucose metabolism in humans. *J Diabetes Complications*. 2018;32(9):845-850. doi:10.1016/j.jdiacomp.2018.06.013
  264. Andrukhova O, Slavic S, Smorodchenko A, et al. FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure. *EMBO Mol Med*. 2014;6(6):744-759.

doi:10.1002/emmm.201303716

265. Zhang B, Umbach AT, Chen H, et al. Up-regulation of FGF23 release by aldosterone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;470(2):384-390. doi:10.1016/j.bbrc.2016.01.034
266. Mhatre KN, Wakula P, Klein O, et al. Crosstalk between FGF23- and angiotensin II-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in pathological cardiac hypertrophy. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(23):4403-4416. doi:10.1007/s00018-018-2885-x
267. Humalda JK, Riphagen IJ, Assa S, et al. Fibroblast growth factor 23 correlates with volume status in haemodialysis patients and is not reduced by haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(9):1494-1501. doi:10.1093/ndt/gfv393
268. Guo R, Liu S, Spurney RF, Quarles LD. Analysis of recombinant Phex: an endopeptidase in search of a substrate. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;281(4):E837-47. doi:10.1152/ajpendo.2001.281.4.E837
269. Ito N, Wijenayaka AR, Prideaux M, et al. Regulation of FGF23 expression in IDG-SW3 osteocytes and human bone by pro-inflammatory stimuli. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;399:208-218. doi:10.1016/j.mce.2014.10.007
270. White KE, Cabral JM, Davis SI, et al. Mutations that cause osteoglophonic dysplasia define novel roles for FGFR1 in bone elongation. *Am J Hum Genet.* 2005;76(2):361-367. doi:10.1086/427956
271. Imanishi Y, Inaba M, Nakatsuka K, et al. FGF-23 in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *Kidney Int.* 2004;65(5):1943-1946. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00604.x
272. Christov M, Waikar SS, Pereira RC, et al. Plasma FGF23 levels increase rapidly after acute kidney injury. *Kidney Int.* 2013;84(4):776-785. doi:10.1038/ki.2013.150
273. Mace ML, Gravesen E, Hofman-Bang J, Olgaard K, Lewin E. Key role of the kidney in the regulation of fibroblast growth factor 23. *Kidney Int.* 2015;88(6):1304-1313. doi:10.1038/ki.2015.231
274. Tan S-J, Crosthwaite A, Langsford D, et al. Mineral adaptations following kidney transplantation. *Transpl Int.* 2017;30(5):463-473. doi:10.1111/tri.12925
275. Baia LC, Heilberg IP, Navis G, de Borst MH, NIGRAM investigators. Phosphate and FGF-23 homeostasis after kidney transplantation. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(11):656-666. doi:10.1038/nrneph.2015.153
276. Baia LC, Humalda JK, Vervloet MG, et al. Fibroblast Growth Factor 23 and Cardiovascular Mortality after Kidney Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(11):1968-1978. doi:10.2215/CJN.01880213
277. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Gao Z, Curhan G, Cholesterol And Recurrent Events Trial Investigators. Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation.*

- 2005;112(17):2627-2633. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.553198
278. Marthi A, Donovan K, Haynes R, et al. Fibroblast Growth Factor-23 and Risks of Cardiovascular and Noncardiovascular Diseases: A Meta-Analysis. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(7):2015-2027. doi:10.1681/ASN.2017121334
  279. Olauson H, Qureshi AR, Miyamoto T, et al. Relation between serum fibroblast growth factor-23 level and mortality in incident dialysis patients: are gender and cardiovascular disease confounding the relationship? *Nephrol Dial Transpl*. 2010;25(9):3033-3038. doi:10.1093/ndt/gfq191
  280. Wright CB, Dong C, Stark M, et al. Plasma FGF23 and the risk of stroke: the Northern Manhattan Study (NOMAS). *Neurology*. 2014;82(19):1700-1706. doi:10.1212/WNL.0000000000000410
  281. Isakova T, Cai X, Lee J, et al. Longitudinal FGF23 Trajectories and Mortality in Patients with CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(2):579-590. doi:10.1681/ASN.2017070772
  282. Grabner A, Amaral AP, Schramm K, et al. Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. *Cell Metab*. 2015;22(6):1020-1032. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.002
  283. Bacchetta J, Pelletier S. Vitamin D deficiency is associated with mortality in maintenance dialysis: moving forward from epidemiology to clinical trials. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(10):1679-1682. doi:10.1093/ndt/gfy122
  284. Zhou C, Mei C, Dai B, Xue C. Fibroblast Growth Factor-23 May Follow Cardiovascular Disease Rather than Causing It in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(10):2602. doi:10.1681/ASN.2018050517
  285. Sullivan C, Sayre SS, Leon JB, et al. Effect of food additives on hyperphosphatemia among patients with end-stage renal disease: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2009;301(6):629-635. doi:10.1001/jama.2009.96
  286. Streja E, Lau WL, Goldstein L, et al. Hyperphosphatemia is a combined function of high serum PTH and high dietary protein intake in dialysis patients. *Kidney Int Suppl*. 2013;3(5):462-468. doi:10.1038/kisup.2013.96
  287. Caria S, Cupisti A, Sau G, Bolasco P. The incremental treatment of ESRD: a low-protein diet combined with weekly hemodialysis may be beneficial for selected patients. *BMC Nephrol*. 2014;15(1):172. doi:10.1186/1471-2369-15-172
  288. Goto S, Nakai K, Kono K, et al. Dietary phosphorus restriction by a standard low-protein diet decreased serum fibroblast growth factor 23 levels in patients with early and advanced stage chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2014;18(6):925-931. doi:10.1007/s10157-014-0947-4
  289. Ketteler M, Liangos O, Biggar PH. Treating hyperphosphatemia - current and advancing drugs. *Expert Opin Pharmacother*. 2016;17(14):1873-1879. doi:10.1080/14656566.2016.1220538

290. Block GA, Kilpatrick RD, Lowe KA, Wang W, Danese MD. CKD-mineral and bone disorder and risk of death and cardiovascular hospitalization in patients on hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013;8(12):2132-2140. doi:10.2215/cjn.04260413
291. Covic A, Passlick-Deetjen J, Krocak M, et al. A comparison of calcium acetate/magnesium carbonate and sevelamer-hydrochloride effects on fibroblast growth factor-23 and bone markers: post hoc evaluation from a controlled, randomized study. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(9):2383-2392. doi:10.1093/ndt/gft203
292. Diaz-Tocados JM, Peralta-Ramirez A, Rodríguez-Ortiz ME, et al. Dietary magnesium supplementation prevents and reverses vascular and soft tissue calcifications in uremic rats. *Kidney Int.* 2017;92(5):1084-1099. doi:10.1016/j.kint.2017.04.011
293. Nagano N, Miyata S, Obana S, et al. Sevelamer hydrochloride, a calcium-free phosphate binder, inhibits parathyroid cell proliferation in partially nephrectomized rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18 Suppl 3:iii81-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12771309>. Accessed December 12, 2018.
294. Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M, et al. Comparison of calcium acetate and sevelamer on vascular function and fibroblast growth factor 23 in CKD patients: a randomized clinical trial. *Am J Kidney Dis.* 2012;59(2):177-185. doi:10.1053/j.ajkd.2011.11.007
295. Evenepoel P, Selgas R, Caputo F, et al. Efficacy and safety of sevelamer hydrochloride and calcium acetate in patients on peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(1):278-285. doi:10.1093/ndt/gfn488
296. Ruospo M, Palmer SC, Natale P, et al. Phosphate binders for preventing and treating chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Cochrane database Syst Rev.* 2018;8:CD006023. doi:10.1002/14651858.CD006023.pub3
297. Carrillo-López N, Fernández-Martín JL, Alvarez-Hernández D, et al. Lanthanum activates calcium-sensing receptor and enhances sensitivity to calcium. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(9):2930-2937. doi:10.1093/ndt/gfq124
298. Block GA, Fishbane S, Rodriguez M, et al. A 12-week, double-blind, placebo-controlled trial of ferric citrate for the treatment of iron deficiency anemia and reduction of serum phosphate in patients with CKD Stages 3-5. *Am J Kidney Dis.* 2015;65(5):728-736. doi:10.1053/j.ajkd.2014.10.014
299. Van Buren PN, Lewis JB, Dwyer JP, et al. The Phosphate Binder Ferric Citrate and Mineral Metabolism and Inflammatory Markers in Maintenance Dialysis Patients: Results From Prespecified Analyses of a Randomized Clinical Trial. *Am J Kidney Dis.* 2015;66(3):479-488. doi:10.1053/j.ajkd.2015.03.013
300. Sprague SM, Ketteler M, Rastogi A, et al. Effects of sucroferric oxyhydroxide and sevelamer carbonate on chronic kidney disease–mineral bone disorder parameters

- in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. May 2018. doi:10.1093/ndt/gfy127
301. Naveh-Many T, Silver J. Regulation of parathyroid hormone gene expression by hypocalcemia, hypercalcemia, and vitamin D in the rat. *J Clin Invest*. 1990;86(4):1313-1319. doi:10.1172/JCI114840
  302. Sprague SM, Llach F, Amdahl M, Taccetta C, Batlle D. Paricalcitol versus calcitriol in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int*. 2003;63(4):1483-1490. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00878.x
  303. Han T, Rong G, Quan D, et al. Meta-analysis: the efficacy and safety of paricalcitol for the treatment of secondary hyperparathyroidism and proteinuria in chronic kidney disease. *Biomed Res Int*. 2013;2013:320560. doi:10.1155/2013/320560
  304. Armas LAG, Zena M, Lund R, Heaney RP. Calcium absorption response to cholecalciferol supplementation in hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(6):1003-1008. doi:10.2215/CJN.08610812
  305. Felsenfeld A, Rodriguez M, Levine B. New insights in regulation of calcium homeostasis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013;22(4):371-376. doi:10.1097/MNH.0b013e328362141e
  306. Jean G, Mayor B, Hurot J-M, et al. Biological impact of targeted dialysate calcium changes in haemodialysis patients: the key role of parathyroid hormone. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(1):176-182. doi:10.1093/ndt/gfs119
  307. Clark EG, Zimmerman DL. Dialysate Calcium in Limbo: How Low Can You Go? *Am J Kidney Dis*. 2015;66(4):558-560. doi:10.1053/j.ajkd.2015.07.005
  308. Brunelli SM, Sibbel S, Do TP, Cooper K, Bradbury BD. Facility Dialysate Calcium Practices and Clinical Outcomes Among Patients Receiving Hemodialysis: A Retrospective Observational Study. *Am J Kidney Dis*. 2015;66(4):655-665. doi:10.1053/j.ajkd.2015.03.038
  309. Ketteler M, Martin KJ, Wolf M, et al. Paricalcitol versus cinacalcet plus low-dose vitamin D therapy for the treatment of secondary hyperparathyroidism in patients receiving haemodialysis: results of the IMPACT SHPT study. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(8):3270-3278. doi:10.1093/ndt/gfs018
  310. Block GA, Bushinsky DA, Cheng S, et al. Effect of Etelcalcetide vs Cinacalcet on Serum Parathyroid Hormone in Patients Receiving Hemodialysis With Secondary Hyperparathyroidism: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2017;317(2):156-164. doi:10.1001/jama.2016.19468
  311. Martin KJ, Pickthorn K, Huang S, et al. AMG 416 (velcalcetide) is a novel peptide for the treatment of secondary hyperparathyroidism in a single-dose study in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2014;85(1):191-197. doi:10.1038/ki.2013.289
  312. Díaz-Tocados JM, Rodríguez-Ortiz ME, Almadén Y, et al. Calcimimetics maintain bone turnover in uremic rats despite the concomitant decrease in parathyroid hormone concentration. *Kidney Int*. 2019;95(5):1064-1078. doi:10.1016/j.kint.2018.12.015

313. Akaberi S, Clyne N, Sterner G, et al. Temporal trends and risk factors for parathyroidectomy in the Swedish dialysis and transplant population - a nationwide, population-based study 1991 - 2009. *BMC Nephrol.* 2014;15(1):75. doi:10.1186/1471-2369-15-75
314. Hsu Y-H, Yu H-Y, Chen H-J, Li T-C, Hsu C-C, Kao C-H. The Risk of Peripheral Arterial Disease after Parathyroidectomy in Patients with End-Stage Renal Disease. Sands JM, ed. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156863. doi:10.1371/journal.pone.0156863
315. Belsley DA Welsch RE. KE. *Regression Diagnostics: Identifying Influential Data and Sources of Collinearity.* John Wiley & Sons, Inc. (Hoboken EE. UU.: John Wiley & Sons, Inc. NJ, ed.); 1980.
316. Lorenzo-Seva U, Ferrando PJ. FIRE: an SPSS program for variable selection in multiple linear regression analysis via the relative importance of predictors. *Behav Res Methods.* 2011;43(1):1-7. doi:10.3758/s13428-010-0043-y
317. Johnson JW. A Heuristic Method for Estimating the Relative Weight of Predictor Variables in Multiple Regression. *Multivar Behav Res.* 2000;35(1):1-19. doi:10.1207/S15327906MBR3501\_1
318. Tonidandel S, Lebreton JM, Johnson JW. Determining the statistical significance of relative weights. *Psychol Methods.* 2009;14(4):387-399. doi:10.1037/a0017735
319. Bergstrom J, Wehle B. No change in corrected beta 2-microglobulin concentration after cuprophane haemodialysis. *Lancet.* 1987;1(8533):628-629. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2881162>.
320. Goetz R, Nakada Y, Hu MC, et al. Isolated C-terminal tail of FGF23 alleviates hypophosphatemia by inhibiting FGF23-FGFR-Klotho complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(1):407-412. doi:10.1073/pnas.0902006107
321. Vervloet M. Renal and extrarenal effects of fibroblast growth factor 23. *Nat Rev Nephrol.* 2018. doi:10.1038/s41581-018-0087-2
322. Benet-Pagès A, Lorenz-Depiereux B, Zischka H, White KE, Econs MJ, Strom TM. FGF23 is processed by proprotein convertases but not by PHEX. *Bone.* 2004;35(2):455-462. doi:10.1016/j.bone.2004.04.002
323. Patrier L, Dupuy AM, Granger Vallée A, et al. FGF-23 removal is improved by on-line high-efficiency hemodiafiltration compared to conventional high flux hemodialysis. *J Nephrol.* 2013;26(2):342-349. doi:10.5301/jn.5000150
324. Jean G, Terrat J-C, Vanel T, et al. High levels of serum fibroblast growth factor (FGF)-23 are associated with increased mortality in long haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(9):2792-2796. doi:10.1093/ndt/gfp191
325. Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, et al. Instability of fibroblast growth factor-23 (FGF-23): implications for clinical studies. *Clin Chim Acta.* 2011;412(11-12):1008-1011. doi:10.1016/j.cca.2011.02.009

326. Ito N, Fukumoto S, Takeuchi Y, et al. Comparison of two assays for fibroblast growth factor (FGF)-23. *J Bone Miner Metab.* 2005;23(6):435-440. doi:10.1007/s00774-005-0625-4
327. Fülöp T, Tapolyai M, Qureshi NA, et al. The safety and efficacy of bedside removal of tunneled hemodialysis catheters by nephrology trainees. *Ren Fail.* 2013;35(9):1264-1268. doi:10.3109/0886022X.2013.823875
328. Touchberry CD, Green TM, Tchikrizov V, et al. FGF23 is a novel regulator of intracellular calcium and cardiac contractility in addition to cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;304(8):E863-73. doi:10.1152/ajpendo.00596.2012
329. Gonzalez-Parra E, Gonzalez-Casas ML, Arenas MD, et al. Individualization of dialysate calcium concentration according to baseline pre-dialysis serum calcium. *Blood Purif.* 2014;38(3-4):224-233. doi:10.1159/000366126
330. Lammi J, Huppunen J, Aarnisalo P. Regulation of the osteopontin gene by the orphan nuclear receptor NURR1 in osteoblasts. *Mol Endocrinol.* 2004;18(6):1546-1557. doi:10.1210/me.2003-0247
331. Rossaint J, Unruh M, Zarbock A. Fibroblast growth factor 23 actions in inflammation: a key factor in CKD outcomes. *Nephrol Dial Transpl.* 2017;32(9):1448-1453. doi:10.1093/ndt/gfw331
332. Isakova T, Xie H, Barchi-Chung A, et al. Fibroblast growth factor 23 in patients undergoing peritoneal dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(11):2688-2695. doi:10.2215/cjn.04290511
333. Ramirez R, Carracedo J, Merino A, et al. Microinflammation induces endothelial damage in hemodialysis patients: the role of convective transport. *Kidney Int.* 2007;72(1):108-113. doi:10.1038/sj.ki.5002250
334. David V, Francis C, Babitt JL. Ironing out the cross talk between FGF23 and inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;312(1):F1-F8. doi:10.1152/ajprenal.00359.2016
335. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med.* 2000;191(2):275-286. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10637272>. Accessed February 1, 2019.
336. Ohta H, Sakuma M, Suzuki A, et al. Effects of gender and body weight on fibroblast growth factor 23 responsiveness to estimated dietary phosphorus. *J Med Invest.* 2016;63(1-2):58-62. doi:10.2152/jmi.63.58
337. Nigam SK, Bush KT. Uraemic syndrome of chronic kidney disease: altered remote sensing and signalling. *Nat Rev Nephrol.* February 2019. doi:10.1038/s41581-019-0111-1
338. Ronco C, Cruz D. Hemodiafiltration History, Technology, and Clinical Results. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2007;14(3):231-243. doi:10.1053/j.ackd.2007.04.002



339. Maduell F, Moreso F, Pons M, et al. High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(3):487-497. doi:10.1681/ASN.2012080875
340. Duranton F, Cohen G, De Smet R, et al. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(7):1258-1270. doi:10.1681/ASN.2011121175
341. Cohen G, Glorieux G, Thornalley P, et al. Review on uraemic toxins III: recommendations for handling uraemic retention solutes in vitro--towards a standardized approach for research on uraemia. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22(12):3381-3390. doi:10.1093/ndt/gfm210
342. Massry SG. Is parathyroid hormone a uremic toxin? *Nephron.* 1977;19(3):125-130. doi:10.1159/000180876
343. Yamamoto T, Nascimento MM, Hayashi SY, et al. Changes in circulating biomarkers during a single hemodialysis session. *Hemodial Int.* 2013;17(1):59-66. doi:10.1111/j.1542-4758.2012.00720.x
344. Bielez BO, Hecking M, Plischke M, et al. Correlations and time course of FGF23 and markers of bone metabolism in maintenance hemodialysis patients. *Clin Biochem.* 2014;47(13-14):1316-1319. doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.06.009
345. Zimmerman DL, Nesrallah GE, Chan CT, et al. Dialysate calcium concentration and mineral metabolism in long and long-frequent hemodialysis: a systematic review and meta-analysis for a Canadian Society of Nephrology clinical practice guideline. *Am J Kidney Dis.* 2013;62(1):97-111. doi:10.1053/j.ajkd.2013.02.357
346. Cernaro V, Lucisano S, Canale V, et al. Acetate-free biofiltration to remove fibroblast growth factor 23 in hemodialysis patients: a pilot study. *J Nephrol.* 2018;31(3):429-433. doi:10.1007/s40620-017-0393-y
347. Esquivias-Motta E, Martín-Malo A, Buendia P, et al. Hemodiafiltration With Endogenous Reinfusion Improved Microinflammation and Endothelial Damage Compared With Online-Hemodiafiltration: A Hypothesis Generating Study. *Artif Organs.* 2017;41(1):88-98. doi:10.1111/aor.12704
348. Potier J, Bowry S, Canaud B. Clinical Performance Assessment of CorDiax Filters in Hemodialysis and Hemodiafiltration. *Contrib Nephrol.* 2017;189:237-245. doi:10.1159/000450810
349. Cornelis T, Van Der Sande FM, Eloit S, et al. Acute hemodynamic response and uremic toxin removal in conventional and extended hemodialysis and hemodiafiltration: A randomized crossover study. *Am J Kidney Dis.* 2014;64(2):247-256. doi:10.1053/j.ajkd.2014.02.016
350. Maduell F, Arias-Guillen M, Fontseré N, et al. Elimination of large uremic toxins by a dialyzer specifically designed for high-volume convective therapies. *Blood Purif.* 2014;37(2):125-130. doi:10.1159/000358214
351. Robinson BM, Akizawa T, Jager KJ, Kerr PG, Saran R, Pisoni RL. Factors

- affecting outcomes in patients reaching end-stage kidney disease worldwide: differences in access to renal replacement therapy, modality use, and haemodialysis practices. *Lancet (London, England)*. 2016;388(10041):294-306. doi:10.1016/S0140-6736(16)30448-2
352. Cheung AK, Levin NW, Greene T, et al. Effects of high-flux hemodialysis on clinical outcomes: results of the HEMO study. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(12):3251-3263. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14638924>. Accessed May 4, 2019.
  353. Isakova T, Xie H, Barchi-Chung A, et al. Daily variability in mineral metabolites in CKD and effects of dietary calcium and calcitriol. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012;7(5):820-828. doi:10.2215/CJN.11721111
  354. Wesseling-Perry K, Wang H, Elashoff R, Gales B, Jüppner H, Salusky IB. Lack of FGF23 response to acute changes in serum calcium and PTH in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(10):E1951-6. doi:10.1210/jc.2014-2125
  355. Welldon KJ, Findlay DM, Evdokiou A, Ormsby RT, Atkins GJ. Calcium induces pro-anabolic effects on human primary osteoblasts associated with acquisition of mature osteocyte markers. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;376(1-2):85-92. doi:10.1016/j.mce.2013.06.013
  356. Spasovski G, Gelev S, Masin-Spasovska J, Selim G, Sikole A, Vanholder R. Improvement of bone and mineral parameters related to adynamic bone disease by diminishing dialysate calcium. *Bone*. 2007;41(4):698-703. doi:10.1016/j.bone.2007.06.014
  357. Fernández-Martín JL, Martínez-Camblor P, Dionisi MP, et al. Improvement of mineral and bone metabolism markers is associated with better survival in haemodialysis patients: the COSMOS study. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(9):1542-1551. doi:10.1093/ndt/gfv099
  358. Oliveira RB, Cancela AL, Gracioli FG, et al. Early control of PTH and FGF23 in normophosphatemic CKD patients: a new target in CKD-MBD therapy? *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(2):286-291. doi:10.2215/cjn.05420709
  359. Kalantar-Zadeh K, Gutekunst L, Mehrotra R, et al. Understanding sources of dietary phosphorus in the treatment of patients with chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(3):519-530. doi:10.2215/CJN.06080809
  360. Gonzalez-Parra E, Gonzalez-Casas ML, Galán A, et al. Lanthanum carbonate reduces FGF23 in chronic kidney disease Stage 3 patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(8):2567-2571. doi:10.1093/ndt/gfr144

## 15.ANEXOS

### 15.1 Artículo



#### RESEARCH ARTICLE

## Phosphate control in reducing FGF23 levels in hemodialysis patients

Cristian Rodelo-Haad<sup>1,2,3</sup>, Maria E. Rodríguez-Ortiz<sup>1,3</sup>, Alejandro Martín-Malo<sup>1,2,3</sup>\*, M. Victoria Pendón-Ruiz de Mier<sup>1,2,3</sup>, M. Luisa Agüera<sup>1,2,3</sup>, Juan R. Muñoz-Castañeda<sup>1,2,3</sup>, Sagrario Soriano<sup>1,2,3</sup>, Francisco Caravaca<sup>4</sup>, M. Antonia Alvarez-Lara<sup>1,2,3</sup>, Arnold Felsenfeld<sup>5</sup>, Pedro Aljama<sup>1,2,3</sup>, Mariano Rodríguez<sup>1,2,3</sup>

**1** Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Cordoba, Spain, **2** Nephrology Service, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain, **3** RETICS-REDinREN (National Institute of Health Carlos III), Madrid, Spain, **4** Nephrology Service, Infanta Cristina Hospital, Badajoz, Spain, **5** Wadsworth VA, UCLA, Department of Medicine, Veterans Affairs Greater Los Angeles Healthcare System and the David Geffen School of Medicine, University of California Los Angeles, Los Angeles, California

\* [amartinma@senefro.org](mailto:amartinma@senefro.org)

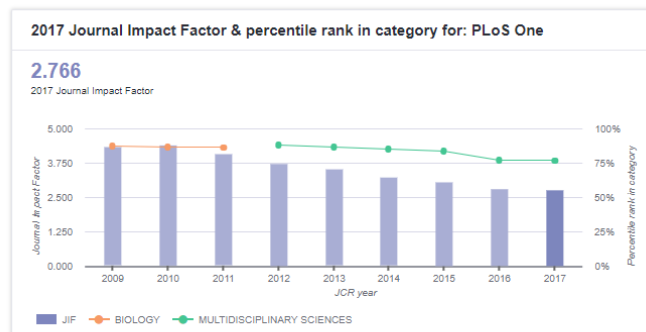


#### InCites Journal Citation Reports

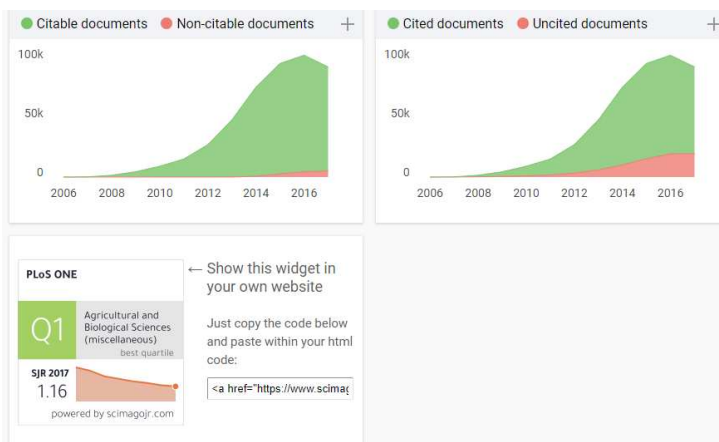
Page 1 of 1



#### 2017 Journal Performance Data for: PLoS One



Downloaded on 9/5/2019 21:20:26 from Journal Citation Reports (©2019 Clarivate Analytics)



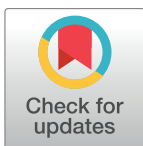
RESEARCH ARTICLE

# Phosphate control in reducing FGF23 levels in hemodialysis patients

Cristian Rodelo-Haad<sup>1,2,3</sup>, Maria E. Rodríguez-Ortiz<sup>1,3</sup>, Alejandro Martin-Malo<sup>1,2,3\*</sup>, M. Victoria Pendon-Ruiz de Mier<sup>1,2,3</sup>, M. Luisa Agüera<sup>1,2,3</sup>, Juan R. Muñoz-Castañeda<sup>1,2,3</sup>, Sagrario Soriano<sup>1,2,3</sup>, Francisco Caravaca<sup>4</sup>, M. Antonia Alvarez-Lara<sup>1,2,3</sup>, Arnold Felsenfeld<sup>5</sup>, Pedro Aljama<sup>1,2,3</sup>, Mariano Rodríguez<sup>1,2,3</sup>

**1** Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, Cordoba, Spain, **2** Nephrology Service, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain, **3** RETICs-REDinREN (National Institute of Health Carlos III), Madrid, Spain, **4** Nephrology Service, Infanta Cristina Hospital, Badajoz, Spain, **5** Wadsworth VA, UCLA, Department of Medicine, Veterans Affairs Greater Los Angeles Healthcare System and the David Geffen School of Medicine, University of California Los Angeles, Los Angeles, California

\* [amartinma@senefro.org](mailto:amartinma@senefro.org)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Rodelo-Haad C, Rodríguez-Ortiz ME, Martin-Malo A, Pendon-Ruiz de Mier MV, Agüera ML, Muñoz-Castañeda JR, et al. (2018) Phosphate control in reducing FGF23 levels in hemodialysis patients. PLoS ONE 13(8): e0201537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201537>

**Editor:** Mario Cozzolino, University of Milan, ITALY

**Received:** March 2, 2018

**Accepted:** July 4, 2018

**Published:** August 7, 2018

**Copyright:** © 2018 Rodelo-Haad et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This study was supported by grants from the National Institute of Health Carlos III (FIS 14/00638, FIS 17/01785, and FIS 17-01010), the Consejería de Salud of Junta de Andalucía (PI-0311-2014 and PI-0136-2016), the REDinREN from the National Institute of Health Carlos III and the EUTox Work group. JR Muñoz-Castañeda is a senior researcher supported by the Nicolás Monardes Programme from Consejería de

## Abstract

### Background

In hemodialysis patients, high levels of Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) predict mortality. Our study was designed to test whether the control of serum phosphate is associated with a reduction in serum FGF23 levels. Additionally other variables with a potential effect on FGF23 levels were evaluated.

### Material and methods

The effect of sustained (40-weeks) control of serum phosphate on FGF23 levels (intact and c-terminal) was evaluated in 21 stable hemodialysis patients that were not receiving calcimimetics or active vitamin D. Patients received non-calcium phosphate binders to maintain serum phosphate below 4.5 mg/dl. In an additional analysis, values of intact-FGF23 (iFGF23) and c-terminal FGF23 (cFGF23) from 150 hemodialysis patients were correlated with parameters of mineral metabolism and inflammation. Linear mixed models and linear regression were performed to evaluate longitudinal trajectories of variables and the association between FGF23 and the other variables examined.

### Results

During the 40-week treatment, 12 of 21 patients achieved the target of serum phosphate <4.5 mg/dl. In these 12 patients, iFGF23 decreased to less than half whereas cFGF23 did not reduce significantly. In patients with serum phosphate >4.5 mg, iFGF23 and cFGF23 increased two and four-fold respectively as compared with baseline. Furthermore, changes in serum phosphate correlated with changes in C-reactive protein (*hs*-CRP). In our 150 hemodialysis patients, those in the higher tertile of serum phosphate also showed increased *hs*-CRP, iPTH, iFGF23 and cFGF23. Multiple regression analysis revealed that iFGF23

Salud-SAS (Junta de Andalucía). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** MAAL has received lecture fees from Fresenius Medical Care and AMGEN. M. R. has received research grants from Amgen and Fresenius Medical Care and lecture fees from the following companies: Amgen, Abbott, Shire, and Fresenius Medical Care. AMM has received lecture fees from Fresenius Medical Care and Bellico in the last two years. All the other authors declare no conflict of interest to disclose. The companies pointed in the financial disclosures had no role in the study design, collection, analysis, interpretation of data nor preparation of the manuscript. The results presented in this paper have not been published previously in whole or part, except in abstract format. This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials

levels directly correlated with both serum phosphate and calcium, whereas cFGF23 correlated with serum phosphate and *hs*-CRP but not with calcium.

## Conclusions

The control of serum phosphate reduced iFGF23. This reduction was also associated with a decreased in inflammatory parameters. Considering the entire cohort of hemodialysis patients, iFGF23 levels correlated directly with serum phosphate levels and also correlated inversely with serum calcium concentration. The levels of cFGF23 were closely related to serum phosphate and parameters of inflammation.

## Introduction

Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) is a hormone secreted by osteocytes and mature osteoblasts. FGF23 enhances urinary phosphate excretion and reduces renal production of 1,25 dihydroxy-vitamin D ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ) [1–3]. In chronic kidney disease (CKD), FGF23 is increased in early stages of renal disease even before phosphate retention occurs [4–7]. Furthermore, FGF23 is known to inhibit parathyroid hormone (PTH) secretion, but in CKD FGF23 fails to inhibit PTH secretion due to reduced expression of FGFR1 and Klotho in uremic hyperplastic parathyroid glands [8]. Conversely, PTH stimulates FGF23 production [9]. Recent studies have shown that low serum calcium (Ca) may be associated with low FGF23 production [10–12]. However, cell-sensing mechanisms triggering FGF23 production and secretion have not been fully characterized. Some studies have failed to demonstrate significant changes in serum FGF23 levels following short-term control of serum phosphate, calcium or PTH [13,14]. Furthermore, the level of complexity of FGF23 regulation has further increased because of recent evidence that both inflammation and iron status also influence the production of FGF23 [15–18]. Moreover, there are circulating fragments of c-terminal and intact FGF23, both of which are elevated in hemodialysis patients. However, it is not clear whether both molecules have the same clinical significance.

A matter of concern for clinicians is that high levels of FGF23 are strongly associated with cardiovascular disease (CVD), and an independent predictor of mortality [19–22]. Thus, control of FGF23 is likely a major issue in clinical practice.

In patients with CKD, studies have shown that the control of serum phosphate using oral phosphate binders can reduced serum FGF23 levels [23–25]. The effect of the control of serum phosphate on FGF23 in dialysis patients has not been sufficiently evaluated. Some studies have reported a reduction of FGF23 after control of serum phosphate [26–30], however, other studies have not reported the same effect [31]. Moreover, it is unknown to what extent a control of phosphate below the upper limit of normal may affect the levels of intact and/or c-terminal FGF23 in hemodialysis patients. Finally, it is also unknown whether inflammation mitigates the potential reduction in FGF23 obtained by hyperphosphatemia control.

The goal of the present study was to evaluate in stable hemodialysis patients, the effect of long-term control of serum phosphate concentration on FGF23 levels (both c-terminal and intact molecule). Our study also aimed to evaluate whether other factors besides phosphate, such as inflammation, calcium and PTH are associated with high serum concentrations of the two FGF23 molecules so they could be used as potential targets to reduce the levels of FGF23

## Materials and methods

### The effect of long-term control of serum phosphate concentration on FGF23 levels

**Patients.** The effect of long-term (40 weeks) control of serum phosphate on FGF23 levels was tested in a group of 21 hemodialysis patients ([S1 Dataset](#)). Patients were selected from a total of 150 clinically stable HD patients ([S2 Dataset](#)). A detailed description of the demographic, biochemical data and treatment characteristics of the 21 selected as well as the 150 patients is shown in [Table 1](#).

**Table 1. Demographic, clinical and biochemical characteristics of the 21 patients included in the longitudinal analysis and the cross-sectional study ( $n = 150$ ).**

Variable	$n = 21$	$n = 150$
Age (years) <sup>§</sup>	70.0 (62.0–76.5)	71.0 (58.7–81.0)
BMI <sup>a, §</sup>	26.3 (23.1–30.2)	26.1 (22.1–30.2)
Gender (n, %)		
Male	12 (57.1)	85 (56.7)
Female	9 (42.9)	65 (43.3)
<b>Renal disease</b>		
Unknown (%)	38.1	36.0
Diabetes (%)	14.3	18.0
Hypertension (%)	4.8	5.3
Glomerulonephritis (%)	14.3	10.7
Polycystic (%)	9.5	14.0
Others (%)	19.0	16.0
<b>Comorbidities</b>		
Hypertension (%)	71.4	83.3
Diabetes (%)	23.8	29.3
Coronary artery disease (%)	23.8	21.3
Cerebrovascular disease (%)	14.3	12.7
Charlson Comorbidity index <sup>§</sup>	4.0 (3.0–5.0)	4.0 (2.0–5.0)
<b>Vascular Access</b>		
AV Fistula, n (%)	11 (52.4)	102 (68.0)
Catheters, n (%)	6 (28.6)	41 (27.3)
Grafts, n (%)	4 (19)	7 (4.7)
Dialysate Calcium 3 mEq/L (n, %)	21 (100)	131 (87.3)
Dialysis technique	21 (100)	69 (46)
HF-HD (n, %)	0	81 (54)
OL-HDF (n, %)		
Dialysis vintage (months) <sup>b, §</sup>	53.7 (33.7–83.8)	50.1 (17.5–82.1)
Dialysis Duration (min) <sup>§</sup>	245.0 (243.0–250.0)	250.0 (240.0–250.0)
KtV <sup>§</sup>	2.0 (1.8–2.4)	1.9 (1.7–2.3)
Kt (L/session) <sup>§</sup>	60.1 (48.8–66.65)	59.8 (52.0–64.0)
Albumin (g/L)	3.6 (3.3–3.8)	3.7 (3.4–3.9)
Hb (g/L) <sup>c, §</sup>	11.2 (10.4–11.9)	11.2 (10.4–12.0)
TSAT (%) <sup>d, §</sup>	29.0 (21.5–37.5)	26.0 (21.0–34.0)
Ferritin (ng/dl) <sup>§</sup>	529.0 (351.5–757.0)	468.5 (327.0–742.2)
hs-CRP (mg/L) <sup>e, §</sup>	8.0 (4.1–11.4)	7.2 (3.5–10.8)
Ca (mg/dL) <sup>e, §</sup>	8.9 (8.5–9.3)	8.8 (8.4–9.2)
iCa (mEq/L) <sup>f, §</sup>	2.2 (2.1–2.2)	2.2 (2.1–2.3)

(Continued)

Table 1. (Continued)

Variable	n = 21	n = 150
P (mg/dl) <sup>g, §</sup>	4.3 (3.6–5.5)	4.3 (3.7–5.3)
Alkaline phosphatase (U/L) <sup>§</sup>	85.5 (74.0–108.7)	90.5 (71.0–121.0)
iPTH (pg/ml) <sup>h, §</sup>	284.0 (199.5–445.0)	263.0 (151.7–434.5)
25(OH)D (ng/ml) <sup>i, §, *</sup>	9.2 (8.5–18.)	8.1 (6.9–10.5)
1,25 (OH) <sub>2</sub> D (pg/ml) <sup>j, §, *</sup>	9.2 (7.7–10.3)	11.0 (5.0–14.8)
iFGF23 (pg/ml) <sup>k, §</sup>	614.0 (346.0–958.5)	502.5 (167.0–1224.5)
cFGF23 (RU/ml) <sup>l, §</sup>	880.0 (547.5–1443.5)	900.5 (400.2–1819.7)
Phosphate Binders (n, %)	21 (100)	67 (44.7)
Paricalcitol (n, %)	—	41 (27.3)
Cinacalcet (n, %)	—	20 (13.3)

<sup>§</sup> Mean ± Standard deviation (SD)

<sup>§</sup> Median and Interquartile Range (IQR)

<sup>a</sup> BMI, Body Mass Index

<sup>b</sup> Dialysis Vintage, Time since the initiation of dialysis

<sup>c</sup> Hb, Hemoglobin

<sup>d</sup> TSAT, Transferrin Saturation

<sup>e</sup> *hs*-CRP, C Reactive Protein

<sup>f</sup> iCa, Ionized Serum Calcium

<sup>g</sup> P, Serum Phosphate

<sup>h</sup> PTH, Intact Parathyroid Hormone

<sup>i</sup> 25 (OH)D, 25 hydroxy vitamin D (calcidiol)

<sup>j</sup> 1,25 (OH)<sub>2</sub> D, 1,25 dihydroxy vitamin D (calcitriol)

<sup>k</sup> i-FGF23, Intact Fibroblast Growth Factor 23

<sup>l</sup> c-FGF23, C-Terminal Fibroblast Growth Factor 23.

— Normal range: serum P were between (2.4 to 4.5 mg/dL); serum iCa (1.13–1.32 mmol/L); 25 (OH) D (8–42 ng/mL); 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> (18–71 pg/mL); iPTH (15–65 pg/mL); *hs*-CRP0 (3 to 5 mg/L); albumin (3.4 to 5 g/dL) and Alkaline Phosphatase (35 to 104 U/L).

— To convert iCa from mEq/L to mmol/L, multiply by 0.5.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201537.t001>

Inclusion in the longitudinal study was performed as follows: from the total of 150 patients, we included only patients that were on the same hemodialysis modality, HF-HD (n = 69). Twenty-six out of the 69 patients were excluded because they were on vitamin D or cinacalcet, which directly affects FGF23 values [32]. Patients on calcium containing phosphate binders (n = 14) were also excluded since they have been reported to have less effect than calcium-free phosphate binders in reducing FGF23 [33]. Patients who underwent kidney transplantation or died (n = 8) during follow-up were also excluded from the analysis. Finally, patients with poor nutrition and unstable medical condition or unwillingness to participate were also excluded. Thus, the final group included all patients treated with calcium-free phosphate binders (n = 21). Therefore, patients included in the longitudinal did not received calcium-based phosphate binders, paricalcitol nor cinacalcet before or during the study. Furthermore, they all received standard hemodialysis with a dialysis bath containing a calcium dialysate of 3mEq/L.

These 21 patients received standard dietary phosphate counseling as part of the routine dietary education provided to all of our dialysis patients. All patients received lanthanum carbonate or sevelamer to maintain serum phosphate below 4.5 mg/dl. The use of one or the other binder was based on patient and doctors' preferences. The dose and duration of phosphate binders was modified by their nephrologist according to the serum phosphate concentration



that was measured every two weeks. The dose of dialysis remained unchanged during the study. At the end of study, patients that achieved a serum phosphate below 4.5 mg/dL ( $P < 4.5$  mg/dL) were compared with those with serum phosphate  $> 4.5$  mg/dL. The target of a final serum phosphate  $< 4.5$  mg/dL was based on the median serum phosphate for each patient throughout the last 8 weeks of follow-up in agreement with the Spanish Society of Nephrology [34] and KDIGO recommendations [35].

The primary outcome in longitudinal analyses was to evaluate changes in serum FGF23 concentrations between the baseline and week-40 in patients with serum phosphate below or above 4.5 mg/dL. Other outcomes included modifications in serum concentration of phosphate, total calcium, ionized calcium, iPTH, *hs*-CRP, 25 (OH) D, and 1,25 (OH)<sub>2</sub> D.

### Analysis of serum FGF23 levels in hemodialysis patients (n = 150)

A cross-sectional analysis was performed in 150 patients undergoing regular hemodialysis to determine serum concentrations of iFGF23 and cFGF23 and its relation with other parameters. The characteristics of the patients are shown in Table 1. From a total of 162 patients receiving hemodialysis in our facilities, we included a total of 150 that fulfilled the following inclusion criteria: on hemodialysis for more than three months and clinically stable without inflammatory disease, infection or malignancy. Patients with previous parathyroidectomy, inability to provide written informed consent (cognitive impairment) or unwillingness to donate blood samples for this study were not included.

### Blood samples, measurements, and assays

Plasma blood samples were obtained before the mid-week hemodialysis session. Serum phosphate and serum ionized calcium were measured within the next 6 hours after extraction. Aliquots for the measurement of iPTH, 25(OH) D, 1,25 (OH)<sub>2</sub> D and both iFGF23 and cFGF23 were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  so that all samples were measured the same day.

Blood ionized calcium was measured by the specific electrode (Ciba-Corning 800 series blood gas analyzer, Ciba-Corning, Essex, UK; reference range, 1.13–1.32 mmol/l). Serum phosphate was measured by spectrophotometry (Biosystems, Barcelona, Spain; reference range, 2.4–4.5 mg/dl). Vitamin-D levels 25(OH)D and 1,25 (OH)<sub>2</sub>D, were measured by RIA (Immunodiagnostic Systems, Boldon, UK; reference range 8–42 ng/ml and 18–71 pg/ml respectively). Serum PTH by IRMA (Coated bead, Scantibodies Laboratory, Santee, CA; reference range, 15–65 pg/ml). The cFGF23 molecule was measured in plasma by a two-site ELISA (Immutopics Inc., San Clemente, CA. Intra- and inter-assay CVs were 2.4% and 4.7%) and iFGF23 was measured by ELISA that recognized the intact active protein (Kainos Laboratories, Tokyo, Japan. Intra- and inter-assay CVs were 2.8% and 3.8%; reference range, 8.2–54.3 pg/ml). C-reactive protein was measured by the high-sensitivity assay (reference range, 0.3–5 mg/l). Immunospectrophotometry (bromocresol purple) was used to measure serum albumin (reference range, 3.4–5 g/dl). Serum alkaline phosphatase was determined by the 4-nitro-phenyl phosphate assay (reference range, 35–104 U/l). The study was approved by the local institutional ethics committee (Comité de Ética de la Investigación de Córdoba; ref.2769, protocol FGF23\_HD-2015). Written Informed consent was obtained from all patients. This research partially describes the results of protocol: NCT02697578.

### Statistical analyses

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation, (SD) or median (interquartile range, IQR) as appropriate. Categorical data are expressed as frequencies and proportions. Spearman correlation test was used to evaluate correlations between two variables. Nonparametric comparisons of group differences, such as Mann-Whitney and Kruskal–Wallis tests were used for



quantitative variables where appropriate. On the contrary, parametric comparisons were performed using the one-way ANOVA with Bonferroni corrections for multiple comparisons.

Linear mixed models were used to compare longitudinal changes in serum phosphate, total calcium, iPTH, and hs-CRP between groups over time. iFGF23, cFGF23, serum ionized calcium, vitamin D, ferritin and TSAT from baseline to end of the study were analyzed using the paired T-test or the Wilcoxon signed-rank test as appropriate. Whether patients achieved or not the final serum phosphate target (final serum phosphate <4.5 mg/dl versus >4.5 mg/dl) was treated as fixed-effects. If the P-value comparing variables curves in patients with final serum phosphate <4.5 mg/dl versus those with final serum phosphate >4.5 mg/dl was significant, we also analyzed between-group differences in each of the variables. We also tested for interactions between serum phosphate and changes in hs-CRP (phosphate x change in hs-CRP) in relation to FGF23 serum levels.

Owing to the non-normal distribution, variables such as FGF23, iPTH, and hs-CRP were log-natural transformed. Patients were separated into two groups according to serum phosphate above or below its median concentration (4.35 mg/dL), and into tertiles of serum phosphate and contrasted in terms of all the other variables analyzed. Linear regression models (forward stepwise selection procedure) were used to examine factors that may affect the values of serum intact and c-terminal FGF23 in the overall population ( $n = 150$ ). Variables that were statistically significant in the univariable analysis and others considered clinically relevant were included in the multivariable analysis. Then, additional multivariable regression analysis were performed in patients with serum phosphate levels below or above the median. Multicollinearity was corrected by restricting the condition index up to a maximum of 20, following Belsley's criteria [36]. Additionally, the proportionate contribution of each predictor on the coefficient of determination ( $R^2$ ) was quantified by the calculation of the Johnson's *Relative Weights* (RWs) [37,38]. RWs were calculated for all the variables included in the linear regression analysis although some of them were not statistically significant. RWs significance test were calculated as described elsewhere [39] and exclusively for variables statistically significant in linear regression models to enhance interpretability. RWs significance are reported as confidence intervals (CI); if zero is excluded in the CI, weights are significantly different. This statistical approach measures to what extent (expressed in percent) each variable contribute to regression equation in combination with other variables (RWs). Given the remarkable association between serum phosphate levels and FGF23, we finally stratified patients into different groups according to the respective median values of serum phosphate, iFGF23 and cFGF23. Four different groups were obtained combining high or low serum phosphate (P) with high or low iFGF23. Another four groups were obtained by combining high or low serum phosphate with high and low serum levels of cFGF23. According to values of iFGF23 the groups were: low P/low iFGF23, low P/high iFGF23, high P/low iFGF23, and high P/high iFGF23. In relation to cFGF23 the groups were: low P/low cFGF23, low P/high cFGF23, high P/low cFGF23, and high P/high cFGF23. SPSS statistics software 15.0 (Chicago, Illinois) and the GraphPad Prism 6.0c (GraphPad Software, La Jolla, CA) were used to perform all the statistical analysis. Two-sided  $P$  values <0.05 were considered statistically significant.

## Results

### Change in FGF23 levels after long-term control of serum phosphate concentration

Demographic and biochemical data of the 21 patients included in the prospective study are shown in Table 1. Also shown is the information of the 150 patients included in the cross-sectional study.

After 40 weeks, the 21 patients were separated into those that achieved the target serum phosphate concentration, less than 4.5 mg/dL, and those with a serum phosphate above 4.5 mg/dL. At baseline, the patients characteristics and parameters of mineral metabolism, including serum phosphate and FGF23 of both groups were similar independently of whether serum phosphate target was achieved during the study or not (Table 2). The only difference between the two groups at baseline was that of the serum levels of 25 (OH) D slightly lower in patients with serum phosphate >4.5 mg/dL at 40 weeks, [10.0 ng/mL (9.2–19.2) vs 8.0 ng/mL (6.3–9.8);  $P = 0.02$ , (Table 2). The Charlson comorbidity index was similar in both groups.

**Table 2. Baseline clinical and biochemical characteristics of patients included in the longitudinal (40 weeks) study ( $n = 21$ ).** Patients are divided according to final serum phosphate, below or above 4.5 mg/dL. All patients were exposed to a dialysate containing 3 mEq/L of calcium and received HF-HD during the follow-up. Data are expressed as median and interquartile range.

Variable	Week 0 P <4.5 mg/dL ( $n = 12$ )	Week 0 P >4.5 mg/dL ( $n = 9$ )	$P^*$
Age (years) <sup>§</sup>	70.5 (62.5–80.5)	66.0 (56.0–73.0)	0.38
Dialysis Vintage (months) <sup>a, §</sup>	55.8 (23.9–85.6)	53.7 (34.2–98.1)	0.80
Dialysis Duration (min) <sup>§</sup>	245.0 (242.2–250.0)	245.0 (244.0–250.0)	0.55
Charlson comorbidity Index <sup>§</sup>	4.0 (3–5.0)	3.0 (2.0–5.0)	0.21
KtV <sup>§</sup>	1.9 (1.7–2.1)	2.1 (1.9–2.2)	0.11
Kt (L/session) <sup>§</sup>	60.5 (58.4–63.7)	63.6 (56.5–67.5)	0.27
Albumin (g/L)	3.6 (3.3–3.8)	3.5 (3.3–3.9)	0.99
Hb (g/L) <sup>b, §</sup>	11.5 (10.5–12.7)	11.2 (10.1–11.5)	0.19
TSAT (%) <sup>c, §</sup>	30.0 (21.2–40.0)	29.0 (22.0–34.5)	0.50
Ferritin (ng/mL) <sup>§</sup>	506.0 (393.0–700.0)	606.0 (312.0–833.5)	0.86
hs-CRP (mg/L) <sup>d, §</sup>	7.3 (3.3–11.0)	4.7 (2.7–8.8)	0.30
Ca (mg/dL) <sup>e, §</sup>	8.88 (8.54–9.19)	8.93 (8.40–9.46)	0.91
iCa (mEq/L) <sup>f, §</sup>	2.23 (2.15–2.24)	2.26 (2.16–2.31)	0.46
P (mg/dL) <sup>g, §</sup>	4.1 (3.5–4.9)	3.8 (3.5–5.1)	0.80
iPTH (pg/mL) <sup>h, §</sup>	287.3 (206.6–360.2)	236.8 (145.8–358.0)	0.86
25 (OH) D (ng/mL) <sup>i, §</sup>	10.0 (9.2–19.2)	8.0 (6.3–9.8)	0.02
1,25 (OH) <sub>2</sub> D (pg/mL) <sup>j, §</sup>	9.2 (8.4–9.6)	8.6 (7.0–15.)	0.86
iFGF23 (pg/mL) <sup>k, §</sup>	581.0 (491.2–886.0)	709.0 (179.0–1247.5)	0.42
cFGF23 (RU/mL) <sup>l, §</sup>	1034.0 (432.2–1368.7)	880.0 (610.5–2070.5)	0.65

<sup>a</sup> Dialysis Vintage, Time since the initiation of dialysis

<sup>b</sup> Hb, Hemoglobin levels

<sup>c</sup> TSAT, Transferrin Saturation

<sup>d</sup> hs-CRP, C Reactive Protein

<sup>e</sup> Ca, Total serum Calcium

<sup>f</sup> iCa, Serum Ionized Calcium

<sup>g</sup> P, Serum Phosphate

<sup>h</sup> iPTH, Intact Parathyroid Hormone

<sup>i</sup> 25 (OH)D, 25 hydroxy vitamin D (calcidiol)

<sup>j</sup> 1,25 (OH)<sub>2</sub> D, 1,25 dihydroxy vitamin D (calcitriol)

<sup>k</sup> i-FGF23, Intact Fibroblast Growth Factor 23

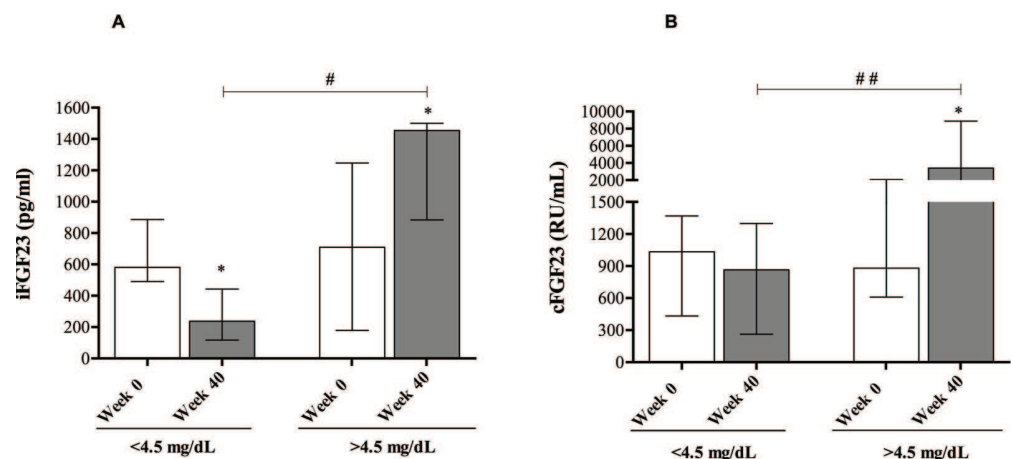
<sup>l</sup> c-FGF23, C-Terminal Fibroblast Growth Factor 23.

<sup>§</sup>Median and interquartile range (IQR)

<sup>\*</sup>  $P$  value.

– The Mann-Whitney test was used as appropriate.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201537.t002>

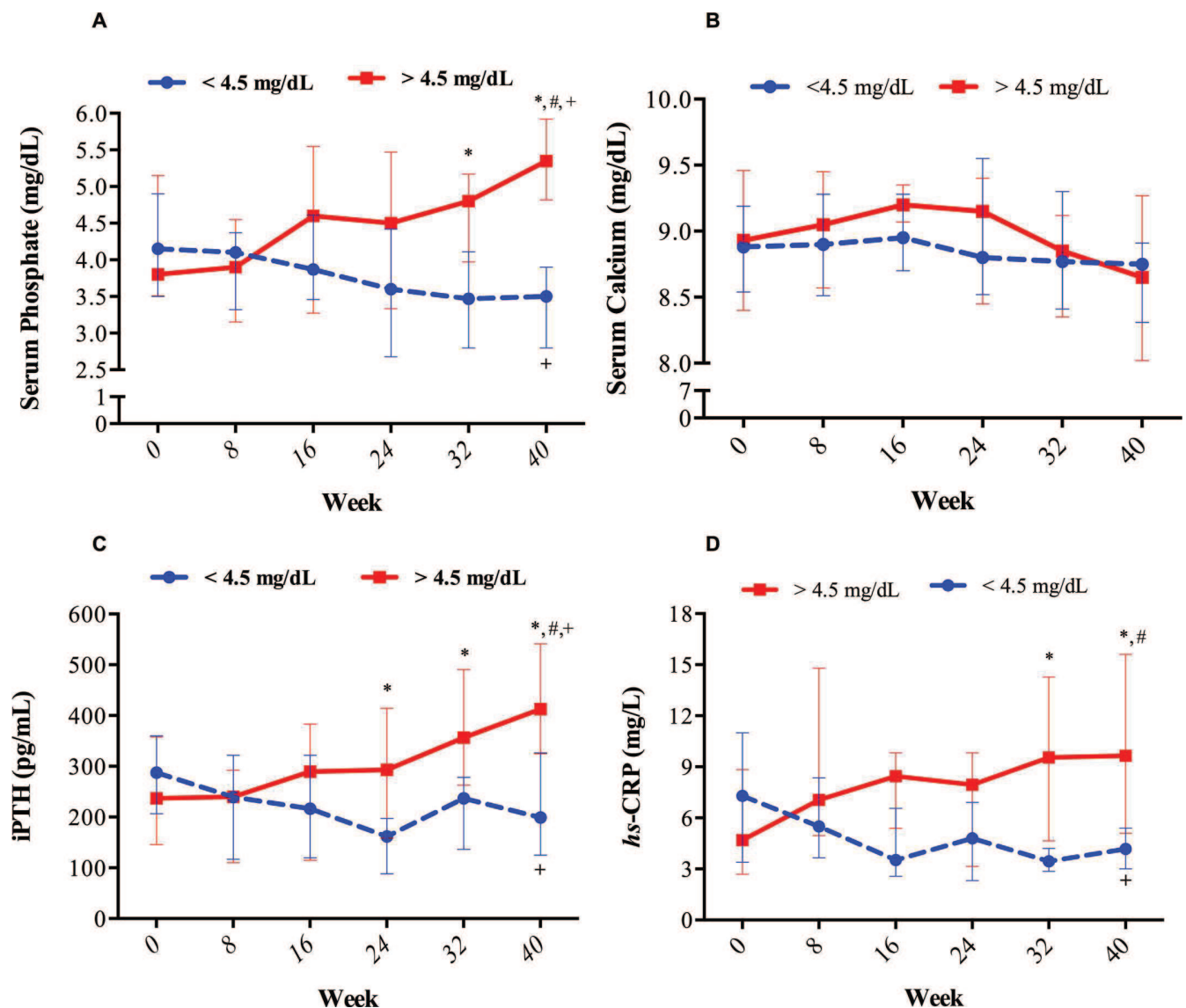


**Fig 1. Serum concentrations of FGF23 at baseline and at week 40 in patients that achieved a serum phosphate concentration of <4.5 mg/dL and >4.5 mg/dL.** (A) Change in iFGF23 concentration; (B) change in serum cFGF23 concentration. Bars represent median and interquartile range. Serum iFGF23 decreased from 581.0 pg/mL (491.2–886.0) to 238.5 pg/mL (116.7–443.5) [median percent change of 63.8% (-75.2–5.40)] in patients that achieved the target of phosphate <4.5 mg/dL. In patients with serum phosphate >4.5 mg/dL, iFGF23 increased from 709.0 pg/mL (179.0–1247.5) to 1445.0 pg/mL (884.0–1500), [median percent change of 65.3% (9.1–368.1)]. cFGF23 did not decrease in those patients that achieved the target [median percent change -36.3 (-60.1–48.3)]. However, in patients with a final serum phosphate >4.5 mg/dL, it increased from 864.5 RU/mL (262.7–1299) to 3402.0 RU/mL (1899.0–8875), [median percent change of 206.9% (108.9–1056.3)]. \*  $P < 0.05$  vs baseline. \*  $P < 0.05$  versus same time different group. \*\*  $P < 0.001$  versus same time, different group.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201537.g001>

The change in serum concentrations of iFGF23 and cFGF23 from baseline to the end of the study is shown in Fig 1. In patients with sustained control of serum phosphate, the serum concentration of iFGF23 decreased from 581.0 pg/mL (491.2–886.0) to 238.5 pg/mL (116.7–443.5),  $p = 0.03$ ; the median percent change was 63.8% (IQR -75.2–5.40). On the contrary, in patients with serum phosphate >4.5 mg/dL, the concentration of iFGF23 increased from 709.0 pg/mL (179.0–1247.5) to 1445.0 pg/mL (884.0–1500),  $p = 0.03$ . [median percent change of 65.3% (9.1–368.1); Fig 1A]. cFGF23 did not decrease in patients with serum phosphate <4.5 mg/dL, but it did increase in patients with phosphate >4.5 mg/dL (Fig 1B).

Longitudinal trajectories of serum phosphate, total calcium, iPTH and hs-CRP are shown in Fig 2. By definition, the serum levels of phosphate were significantly higher in patients with a final serum phosphate >4.5 mg/dL as compared with those who did achieve the target ( $p < 0.001$  for global comparison) (Fig 2A). Between-group differences were reached at week 32 and 40 ( $p < 0.05$ ). The change in serum phosphate was associated with significant and concomitant change in iPTH despite the absence of changes in total serum calcium ( $P < 0.01$  for global comparison) (Fig 2B–2C). hs-CRP also increased in patients with final serum phosphate >4.5 mg/dL ( $P < 0.01$  for global comparison) (Fig 2D). Changes of the different parameters in patients within the same group showed similar results to those obtained by global comparisons. In patients achieving the target, serum phosphate ( $P < 0.01$ ), iPTH ( $P = 0.04$ ), and hs-CRP ( $P < 0.001$ ) decreased significantly (Fig 2A–2D). By contrast, in the group of patients who did not achieve the target, serum phosphate and iPTH showed a significant increase ( $p < 0.001$  for both parameters). The values of hs-CRP showed an increasing trend that did not reach significance ( $P = 0.16$ ). Nevertheless, at week 40, the levels of hs-CRP were significantly higher in patients who did not achieve the target than in those with final serum phosphate <4.5 mg/dL ( $p = 0.02$ ). Between-group differences at the end of the study also showed significant differences in iPTH ( $p < 0.01$ ) (Fig 2C and Table 3). The total serum calcium and serum ionized



**Fig 2.** Change in parameters of mineral metabolism throughout the 40 weeks of follow-up in patients that completed the study with serum phosphate concentration above or below 4.5 mg/dL. In the group of patients with a final serum  $P < 4.5$  mg/dL, 54, 80, 80, 80, 100 and 100% of them had a ranged serum phosphate below the target at week 0, 8, 16, 24, 32 and 40 respectively. On the contrary, in the group with a final serum phosphate  $> 4.5$  mg/dL, 66, 77, 44, 44, 33 and 0% of the patients had serum phosphate levels below the study target along the study period. Dots represent median and whiskers represent IQR. \* Between-group differences  $P < 0.05$ . + Within-group differences  $P < 0.05$  for different groups. #  $P < 0.001$  for global comparison of curves.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201537.g002>

calcium concentration did not change in both groups (Fig 2B and Table 3). No changes were observed from baseline to end of the study in dialysis duration, KtV, Kt, albumin, hemoglobin, TSAT, serum ferritin, 25 (OH) D or 1,25 (OH)<sub>2</sub> D (Table 3). Phosphate x change in hs-CRP interaction was statistically significant ( $p$  for interaction = 0.03).

The IV iron preparation used in our study was the iron sucrose and it was prescribed to five out of 12 patients that reached a serum phosphate  $< 4.5$  mg/dL and 4 out of the 9 that ended with serum phosphate  $> 4.5$  mg/dL. The dose of IV iron was not different in both groups. There was no correlation between baseline ferritin level and the change in iFGF23 ( $r = -0.18$ ,  $p = 0.42$ ) or cFGF23 ( $r = 0.11$ ,  $p = 0.62$ ). No correlation was found between the baseline TSAT

**Table 3. The effect of long-term (40-weeks) control of serum phosphate (serum P <4.5 vs P >4.5 mg/dl) on different variables.**

Variable	Week 40 P <4.5 mg/dL n = 12	Week 40 P >4.5 mg/dL n = 9	P*
Dialysis Duration (mins) <sup>a, §</sup>	245.0 (243.0–247.5)	246.0 (243.5–249.5)	0.50
KtV <sup>§</sup>	1.9 (1.7–2.0)	2.1 (1.8–2.3)	0.27
Kt (L/session) <sup>§</sup>	61.4 (48.7–63.9)	64.0 (53.5–67.5)	0.24
Albumin (g/L)	3.6 (3.3–3.8)	3.5 (3.3–3.9)	0.88
Hb (g/L) <sup>b, §</sup>	11.9 (11.2–13.4)	11.4 (10.7–12.0)	0.19
TSAT (%) <sup>c, §</sup>	29.0 (23.7–46.0)	25.0 (21.5–31.5)	0.19
Ferritin (ng/L) <sup>§</sup>	500.5 (268.7–827.0)	365.0 (173.5–655.5)	0.27
hs-CRP (mg/L) <sup>d, §</sup>	4.1 (3.0–5.4)	9.6 (5.2–15.)	0.02
Ca (mg/dL) <sup>e, §</sup>	8.75 (8.31–8.91)	8.65 (8.02–9.27)	0.91
iCa (mEq/L) <sup>f, §</sup>	2.23 (2.20–2.25)	2.20 (2.05–2.32)	0.91
P (mg/dL) <sup>g, §</sup>	3.5 (2.7–3.9)	5.3 (4.8–5.9)	<0.001
iPTH (pg/ml) <sup>h, §</sup>	199.0 (125.1–326.4)	412.5 (325.0–541.2)	<0.01
25 (OH) D (ng/ml) <sup>i, §</sup>	11.8 (8.10–14.8)	8.29 (6.96–10.8)	0.09
1,25 (OH) <sub>2</sub> D (pg/ml) <sup>j, §</sup>	7.8 (7.2–8.8)	12.9 (5.2–14.4)	0.31
iFGF23 (pg/ml) <sup>k, §</sup>	238.5 (131.7–443.5)	1455.0 (884.0–1500.0)	<0.01
cFGF23 (RU/ml) <sup>l, §</sup>	864.5 (262.7–1299.5)	3402.0 (1899.0–8875.0)	<0.001

<sup>a</sup> Dialysis Duration; Effective duration of the dialysis session

<sup>b</sup> Hb, Hemoglobin levels

<sup>c</sup> TSAT, Transferrin Saturation

<sup>d</sup> hs-CRP, C Reactive Protein

<sup>e</sup> Ca, Total serum Calcium

<sup>f</sup> iCa, Ionized Serum Calcium

<sup>g</sup> P, Serum Phosphate

<sup>h</sup> iPTH, Intact Parathyroid Hormone

<sup>i</sup> 25 (OH)D, 25 hydroxy vitamin D (calcidiol)

<sup>j</sup> 1,25 (OH)<sub>2</sub> D, 1,25 dihydroxy vitamin D (calcitriol)

<sup>k</sup> i-FGF23, Intact Fibroblast Growth Factor 23

<sup>l</sup> c-FGF23, C-Terminal Fibroblast Growth Factor 23.

<sup>§</sup> Median (IQR).

\* P value

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201537.t003>

and the change in iFGF23 ( $r = -0.29$ ,  $p = 0.18$ ) or in cFGF23 ( $r = -0.18$ ,  $p = 0.41$ ). These finding persisted if the analysis was performed in the two groups separately. No association was found between EPO treatment and changes in either iFGF23 or cFGF23.

Regarding the use of phosphate binders, 66.7% ( $n = 14$ ) of patients were on lanthanum carbonate at baseline, and 33.3% ( $n = 7$ ) were on sevelamer. At the end of the study, all patients from the phosphate >4.5 mg/dL group were on both binders. Prescribed doses of phosphate binders during the study are shown in [S1 Fig](#). As expected, patients with a worse phosphate control over the course of the study were prescribed higher doses of phosphate binders. Lanthanum carbonate was discontinued in one patient due to an excessive reduction in serum phosphate.

Further analysis, using the measurements from all patients revealed that the percent change in serum phosphate concentration was proportional to the percent change in both iFGF23 and cFGF23 molecules ([Table 4](#)). Percent change in serum phosphate also correlated with the change in iPTH and hs-CRP, which in turn was also correlated with changes in both FGF23 molecules ([Table 4](#)).

**Table 4. Simple linear correlations between the percent change in serum phosphate concentration, both FGF23 molecules, serum iPTH concentration and *hs*-CRP (as an index of inflammation) in patients after 40 weeks of treatment.**

Variable	iFGF23		cFGF23		Phosphate		iPTH	
	$r^{\#}$	$P^*$	$r^{\#}$	$P^*$	$r^{\#}$	$P^*$	$r^{\#}$	$P^*$
cFGF23 (RU/mL) <sup>b</sup>	0.51	0.01	-	-	-	-	-	-
Phosphate (mg/dL) <sup>c</sup>	0.78	<0.001	0.51	0.01	-	-	-	-
iPTH (pg/mL) <sup>d</sup>	0.47	0.02	0.43	0.04	0.63	<0.01	-	-
<i>hs</i> -CRP (mg/L) <sup>e</sup>	0.49	0.02	0.61	<0.01	0.62	<0.01	0.63	<0.01

<sup>a</sup> iFGF23, Intact Fibroblast Growth Factor 23

<sup>b</sup> cFGF23, C-terminal Fibroblast Growth Factor

<sup>c</sup> P, Serum Phosphate

<sup>d</sup> iPTH, Intact Parathyroid Hormone

<sup>e</sup> *hs*-CRP, High Sensitivity C-Reactive Protein.

The Spearman correlation test was used for all comparison.

<sup>#</sup> Correlation Coefficient.

<sup>\*</sup> *P*-value.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201537.t004>

**Analysis of iFGF23 and cFGF23 values in the entire population of hemodialysis patients.** Further analyses of iFGF23 and cFGF23 levels were performed in our stable HD patients ( $n = 150$ ) (Table 1). Both FGF23 molecules were significantly correlated with the serum concentration of phosphate, *hs*-CRP, age, and iPTH (Table 5 and S2 Fig). Also, the ln-cFGF23 showed a positive correlation with dialysis vintage and a negative correlation with 25 (OH) D (Table 5). Additionally, a significant positive correlation was observed between the serum concentration of serum phosphate and *hs*-CRP (Fig 3). The dose of erythropoietin did not correlate with serum levels of FGF23.

Table 6 shows clinical and biochemical data of patients according to serum phosphate tertiles contrasted in terms of the other parameters. Compared to the lowest tertile, patients in the highest phosphate tertile were more likely to be younger ( $p = 0.09$ ) and showed higher serum *hs*-CRP ( $p = 0.01$ ), iPTH ( $p < 0.001$ ), iFGF23 ( $p < 0.01$ ), and cFGF23 ( $p < 0.001$ ). Furthermore, serum ionized or total calcium was lower in patients with higher serum phosphate. Serum ferritin, TSAT, albumin and Charlson comorbidity index were comparable among groups (Table 6).

In linear regression models, after adjustment for confounding variables, serum phosphate, *hs*-CRP, and also age, were independently correlated with both ln-iFGF23 and ln-cFGF23 levels (Table 7 and 8). Of note, serum ionized calcium, but not ln-iPTH, was also independently associated with high concentration of ln-iFGF23. Dialysis vintage was associated with high ln-cFGF23 levels, but not with elevated ln-iFGF23 (Table 7 and 8).

**FGF23 levels in patients with adequate control of serum phosphate.** Given that phosphate have been reported as one of the most important factors associated with the increase in FGF23, it is important to learn if in patients with acceptable control of serum phosphate, there are other variables that could be targeted to achieve a better control of the FGF23 molecules. Therefore, all patients ( $n = 150$ ) were stratified according to whether the serum phosphate concentration was above or below the median (4.35 mg/L) (S1 Table). In patients with serum phosphate <4.35 mg/L, the ln-iFGF23 correlated with the serum concentration of phosphate and ionized calcium, and, the ln-cFGF23 correlated with serum levels of phosphate and *hs*-CRP (S2 Table). In patients with serum phosphate >4.35 mg/L, the ln-iFGF23 correlated with the serum concentration of phosphate, and *hs*-CRP, and did not correlate with serum ionized calcium (S2 Table). The ln-cFGF23 level correlated positively with serum phosphate, age,



**Table 5. Simple linear correlations between both FGF23 molecules and other demographic, clinical and CKD-MBD parameters ( $n = 150$ ).**

Variable	ln-iFGF23		ln-cFGF23	
	<i>r</i>	<i>P</i> *	<i>r</i>	<i>P</i> *
ln-cFGF23 <sup>a</sup>	0.70	<0.001	—	—
Age (years)	-0.25	<0.01	-0.26	<0.01
Dialysis vintage (Months) <sup>b</sup>	-0.02	0.74	0.21	<0.01
Hb (g/L) <sup>c</sup>	0.05	0.49	-0.01	0.86
TSAT (%) <sup>d</sup>	-0.05	0.49	-0.04	0.58
Ferritin (ng/L)	-0.04	0.58	0.02	0.79
ln-CRP (mg/L) <sup>e</sup>	0.33	<0.001	0.53	<0.001
iCa (mEq/L) <sup>f</sup>	0.03	0.70	-0.14	0.07
P (mg/dL) <sup>g</sup>	0.61	<0.001	0.55	<0.001
ln-iPTH (pg/mL) <sup>h</sup>	0.29	<0.001	0.29	<0.001
25(OH)D (ng/mL) <sup>i</sup>	-0.06	0.44	-0.15	0.05
1,25 (OH) <sub>2</sub> D (pg/mL) <sup>j</sup>	0.03	0.67	0.06	0.46

<sup>a</sup> ln-cFGF23, C-terminal Fibroblast Growth Factor

<sup>b</sup> Dialysis Vintage, Time since the initiation of dialysis

<sup>c</sup> Hb, Hemoglobin levels

<sup>d</sup> TSAT, Transferrin Saturation

<sup>e</sup> ln-CRP, C Reactive Protein

<sup>f</sup> iCa, Serum Ionized Calcium

<sup>g</sup> P, Serum Phosphate

<sup>h</sup> ln-PTH, Intact Parathyroid Hormone

<sup>i</sup> 25 (OH)D, 25 Hydroxyvitamin D (calcidiol)

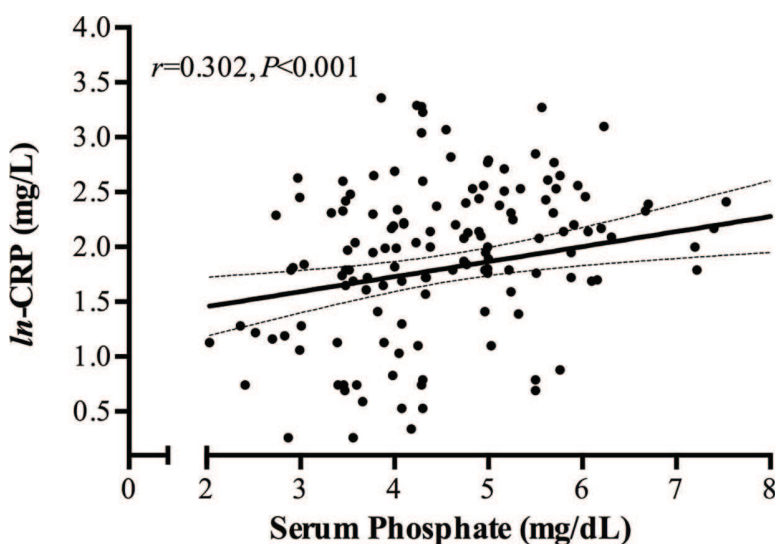
<sup>j</sup> 1,25 (OH)<sub>2</sub>D, 1,25 Dihydroxy vitamin D (calcitriol).

The Spearman correlation test was used for all comparison.

- To convert iCa in mEq/L to mmol/L, multiply by 0.5.

\* *P*-value.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201537.t005>



**Fig 3. Scatter plot of serum phosphate levels and ln-CRP in the 150 patients on regular hemodialysis.**

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201537.g003>

dialysis vintage, and serum *hs*-CRP. There was no correlation between values of *ln*-iPTH and FGF23 concentration (S2 Table). Finally, we also stratified patients into different groups according to the median values of serum phosphate, iFGF23 and cFGF23 (S3 table). Four different groups were obtained combining high or low serum phosphate (P) with high or low iFGF23; another four groups were obtained by combining high or low serum phosphate with high and low serum levels of cFGF23 (S3 table). Again, younger patients showed the highest serum levels of phosphate, iFGF23, and cFGF23. Subjects with high phosphate coinciding with high iFGF23 and cFGF23 showed the highest serum *hs*-CRP levels. The latter group of patients also had the highest iPTH serum levels. Interestingly, the group of patients with low phosphate/high cFGF23 also showed higher *hs*-CRP and longer dialysis vintage (S3 Table).

Table 6. Characteristics of the population included according to phosphate tertiles.

Variable	T1 (n = 49) <3.98 mg/dl	T2 (n = 52) 3.99–4.99 mg/dl	T3 (n = 49) >5 mg/dl	P
Age (years; mean, s.d.)	72.3 ± 15.7	66.2 ± 14.3	67.3 ± 14.5	0.09
BMI (Mean, SEM) <sup>a</sup>	26.4 ± 6.4	26.1 ± 6.2	27.0 ± 4.8	0.73
Gender (male; n, %)	26 (53.1)	31 (59.6)	28 (57.1)	0.79
<b>Comorbidities</b>				
Hypertension (%)	43 (87.8)	42 (80.8)	40 (81.6)	0.59
Diabetes (%)	15 (30.6)	15 (28.8)	14 (28.6)	0.97
Coronary artery disease (%)	13 (26.5)	10 (19.2)	9 (18.4)	0.55
Cerebrovascular disease (%)	4 (8.2)	8 (15.4)	7 (14.3)	0.50
Charlson comorbidity index	4.0(2.0–5.0)	4.0 (2.0–5.0)	4.0 (2.0–5.0)	0.93
<b>Vascular Access</b>				
AV Fistula, n (%)	38 (77.6)	30 (57.7)	33 (67.3)	0.10
Catheters, n (%)	10 (20.4)	17 (32.7)	14 (28.6)	0.37
Grafts, n (%)	1 (2.0)	5 (9.6)	2 (4.1)	0.21
Dialysate Calcium 3 mEq/L (n, %)	44 (89.8)	44 (84.6)	43 (87.8)	0.73
Dialysis technique	28 (44.9)	21 (40.4)	26 (53.1)	0.43
HF-HD (n, %)	27 (55.1)	31 (59.6)	23 (46.9)	
OL-HDF (n, %)				
Dialysis vintage (months) <sup>b, §</sup>	54.8 (16.9–84.5)	49.2 (16.4–76.8)	47.3 (18.6–86.5)	0.96
Albumin (g/L) <sup>§</sup>	3.6 ± 0.3	3.7 ± 0.3	3.7 ± 0.4	0.58
Hb (g/L) <sup>c, §</sup>	11.3 ± 1.2	11.1 ± 1.2	11.1 ± 1.4	0.58
TSAT (%) <sup>d, §</sup>	28.7 ± 15.0	26.9 ± 9.90	28.8 ± 12.3	0.68
Ferritin (ng/L) <sup>§</sup>	436.0 (343.0–714.5)	504.0 (331.5–742.7)	472.0 (287.5–849.5)	0.59
<i>hs</i> -CRP (mg/L) <sup>e, §</sup>	5.2 (2.6–8.2)	7.3 (4.2–10.9)	8.8 (5.8–12.4)	0.01
Ca (mg/dL) <sup>e, §</sup>	8.86 ± 0.47	8.81 ± 0.64	8.55 ± 0.77	0.03
iCa (mEq/L) <sup>g, §</sup>	2.21 ± 0.11	2.20 ± 0.16	2.13 ± 0.19	0.03
P (mg/dl) <sup>h, §</sup>	3.4 (2.9–3.7)	4.3 (4.1–4.8)	5.7 (5.3–6.2)	<0.001
Alkaline phosphatase (U/L) <sup>§</sup>	91.0 (74.5–115.0)	90.0 (69.0–121.7)	90.0 (71.0–124.0)	0.76
iPTH (pg/ml) <sup>i, §</sup>	162.0 (104.0–268.9)	327.5 (167.0–429.7)	392.0 (204.5–672.5)	<0.001
25(OH)D (ng/ml) <sup>j, §</sup>	10.7 ± 6.4	9.9 ± 5.0	9.0 ± 3.7	0.29
1,25 (OH) <sub>2</sub> D (pg/ml) <sup>k, §</sup>	9.7 ± 6.2	10.5 ± 6.7	12.6 ± 6.7	0.08
iFGF23 (pg/ml) <sup>l, §</sup>	158.0 (77.5–438.0)	502.5 (218.5–1167.7)	1030.0 (539.5–1754.0)	<0.01

(Continued)



Table 6. (Continued)

Variable	T1 (n = 49) <3.98 mg/dl	T2 (n = 52) 3.99–4.99 mg/dl	T3 (n = 49) >5 mg/dl	P
cFGF23 (RU/ml) <sup>m, §</sup>	471.0 (191.5–874.0)	959.5 (419.0–2049.7)	1561.0 (879.0–2652.5)	<0.001

<sup>§</sup> Mean ± Standard deviation (SD)

<sup>§</sup> Median and Interquartile Range (IQR)

<sup>a</sup> BMI, Body Mass Index

<sup>b</sup> Dialysis Vintage, Time since the initiation of dialysis

<sup>c</sup> Hb, Hemoglobin serum levels

<sup>d</sup> TSAT, Transferrin Saturation

<sup>e</sup> hs-CRP, C-Reactive Protein

<sup>f</sup> Ca, total serum calcium

<sup>g</sup> Ca, Ionized Serum Calcium

<sup>h</sup> P, Serum Phosphate

<sup>i</sup> iPTH, Intact Parathyroid Hormone

<sup>j</sup> 25 (OH)D, 25 hydroxy vitamin D (calcidiol)

<sup>k</sup> 1,25 (OH)<sub>2</sub> D, 1,25 dihydroxy vitamin D (calcitriol)

<sup>l</sup> iFGF23, Intact Fibroblast Growth Factor 23

<sup>m</sup> cFGF23, C-Terminal Fibroblast Growth Factor 23.

- To convert iCa in mEq/L to mmol/L, multiply by 0.5.

- One-way ANOVA with Bonferroni corrections for multiple comparisons

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201537.t006>

Table 7. Multivariable linear regression analysis showing the association between ln-iFGF23 as dependent variables and mineral metabolism parameters, inflammatory markers, and dialysis features, (n = 150).

Multivariable		ln-iFGF23	
Variable	Beta <sup>§</sup>	95% IC	P
<b>Model 1</b>			
ln-CRP <sup>a</sup>	0.16	0.06–0.48	0.01
iCa <sup>b</sup>	0.23	0.91–2.97	<0.001
P <sup>c</sup>	0.65	0.51–0.76	<0.001
<b>Model 2</b>			
Age	-0.15	-0.02–0.03	0.01
ln-CRP <sup>a</sup>	0.18	0.10–0.51	<0.01
iCa <sup>b</sup>	0.22	0.84–2.86	<0.001
P <sup>c</sup>	0.61	0.48–0.72	<0.001
<b>Model 3</b>			
ln-CRP	0.16	0.06–0.48	<0.01
iCa	0.23	0.91–2.97	<0.001
P <sup>c</sup>	0.65	0.51–0.76	<0.001

<sup>a</sup> hs-CRP, C Reactive Protein

<sup>b</sup> iCa, Serum Ionized Calcium

<sup>c</sup> P, Serum Phosphate.

Model 1: adjusted for serum phosphate, ionized serum calcium, and hs-CRP. (R<sup>2</sup> = 0.47)

Model 2: Adjusted for model 1 plus age, dialysis vintage, serum ferritin, iPTH, 25 (OH) D, and 1,25 (OH)<sub>2</sub>D. (R<sup>2</sup> = 0.50)

Model 3: adjusted for model 1 plus calcium dialysate, the use of calcium-based binders, calcium-free binders, paricalcitol, cinacalcet and erythropoietin (R<sup>2</sup> = 0.47)

<sup>§</sup> Standardized regression coefficients

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201537.t007>

**Table 8. Multivariable linear regression analysis showing the association between ln-cFGF23 as dependent variables and mineral metabolism parameters, inflammatory markers, and dialysis features, ( $n = 150$ ).**

Multivariable		ln-cFGF23	
Variable	Beta <sup>‡</sup>	95% IC	P
<b>Model 1</b>			
ln-CRP <sup>a</sup>	0.35	0.34–0.69	<0.001
P <sup>b</sup>	0.50	0.32–0.52	<0.001
<b>Model 2</b>			
Age	-0.20	-0.02—0.07	<0.001
Dialysis Vintage <sup>c</sup>	0.23	0.003–0.01	<0.001
ln-CRP <sup>a</sup>	0.37	0.37–0.70	<0.001
P <sup>b</sup>	0.44	0.27–0.46	<0.001
<b>Model 3</b>			
ln-CRP <sup>a</sup>	0.35	0.34–0.69	<0.001
P <sup>b</sup>	0.50	0.32–0.52	<0.001

<sup>a</sup> hs-CRP, C Reactive Protein

<sup>b</sup> P, Serum Phosphate

<sup>c</sup> Dialysis vintage, time since the initiation of dialysis.

Model 1: adjusted for serum phosphate, ionized serum calcium, and hs-CRP. ( $R^2 = 0.46$ )

Model 2: adjusted for model 1 plus age, dialysis vintage, serum ferritin, iPTH, ferritin, 25 (OH) D, and 1,25 (OH)<sub>2</sub>D. ( $R^2 = 0.54$ )

Model 3: adjusted for model 1 plus calcium dialysate, the use of calcium-based binders, calcium-free binders, paricalcitol, cinacalcet and erythropoietin ( $R^2 = 0.46$ )

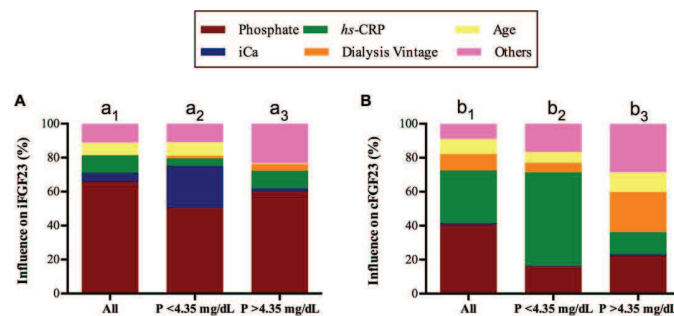
<sup>‡</sup> Standardized regression coefficients

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201537.t008>

The degree of influence or relative weights (expressed in percent) of the various independent variables on serum levels of iFGF23 and cFGF23 is detailed in Fig 4 and S4 Table. In patients with serum phosphate <4.35 mg/dL, serum phosphate concentration contributed 50.3% to the high levels of iFGF23, serum ionized calcium concentration contributed 24.9%, and the hs-CRP only contributed 4.4%. By contrast, in patients with serum phosphate >4.35 mg/dL, although phosphate was still the most influential factor, hs-CRP contributed more than serum ionized calcium (10.6% vs. 1.9%) (Fig 4A). With regard to cFGF23, 81.3% of the relative weight was dependent on serum phosphate, hs-CRP, and dialysis vintage (Fig 4B and S4 Table). Of interest, high cFGF23 levels in patients with serum phosphate <4.35 mg/dL were more dependent on hs-CRP than serum ionized calcium.

## Discussion

The aim of the present study was to determine the effect of long-term control of serum phosphate on FGF23 levels. It was observed that reducing serum phosphate below the upper normal range (4.5 mg/dL) is associated with a decrease in iFGF23 although cFGF23 concentration did not change. By contrast, uncontrolled serum phosphate was associated with an increase in both iFGF23 and cFGF23. Interestingly, control of serum phosphate was also accompanied by a proportional reduction in serum levels of hs-CRP. Cross-sectional analysis of our population ( $n = 150$ ) of hemodialysis patients confirmed a robust effect of serum phosphate concentrations on FGF23 levels. Even in patients with serum phosphate levels below the median, iFGF23 correlated with the prevailing serum phosphate, and also with high values of serum ionized calcium. Serum cFGF23 not only correlated with serum phosphate but also with serum hs-CRP instead of ionized calcium. Taken together, our results suggest that a reduction in serum



**Fig 4. The degree of influence (expressed in percent) of the various independent variables on the serum levels of iFGF23 (A) and cFGF23 (B).** The proportional contribution (Relative weights; RWs) of each of the independent variables on the serum levels of FGF23 were calculated. Statistical significance of RWs were assessed as described elsewhere [38,39]. Statistical significance is based on the values of confidence intervals; if zero is excluded from the confidence interval, the RW is significant. The RWs significance test was run only for variables that showed statistical significance in the linear regression models. The proportional contribution of serum iPTH, 25 (OH) D, 1,25 (OH)<sub>2</sub> D, ferritin, calcium dialysate, the use of cinacalcet or paricalcitol, calcium-based, and calcium-free phosphate binders are grouped as “others” since their individual contribution was limited. S4 Table shows the detailed proportionate contribution of each variable for the entire population and separated according to phosphate levels below or above the median. Lowercase letters above columns identify different groups analyzed, a1-b1 overall population, a2-b2 patients with P < 4.35 mg/dL and a3-b3 patients with P > 4.35 mg/dL for iFGF23 and cFGF23 respectively. For iFGF23 (A) RWs of serum phosphate (CI for significance 0.24–0.47), ionized calcium [iCa] (CI for significance 0.001–0.07) and hs-CRP (CI for significance 0.01–0.10) were significantly different in the entire population (a<sub>1</sub>). Moreover, RWs of serum phosphate was significantly greater than the RWs of iCa, hs-CRP and age RWs. In patients with P < 4.35 mg/dL (a<sub>2</sub>), RWs of serum iCa (CI for significance 0.01–0.26) and phosphate (CI for significance 0.14–0.41) were significant as compared to the other variables. Interestingly, there was no difference between the RWs of phosphate and iCa in this group of patients (a<sub>2</sub>). In patients with phosphate above the median (P > 4.35 mg/dL) [a<sub>3</sub>], only the RWs of hs-CRP (CI for significance 0.00–0.12) and phosphate (CI for significance 0.06–0.45) were significant. The RW of phosphate (59.9%) was significantly greater than that of the RWs of age (CI for significance -0.45–0.04), hs-CRP (CI for significance -0.44–0.02), and iCa (CI for significance -0.49–0.07). (B) Regarding cFGF23, in the overall population (b<sub>1</sub>) serum phosphate remained to be the main contributor (40.6%). Together with phosphate (CI for significance 0.18–0.34), RWs of hs-CRP (CI for significance 0.10–0.26), dialysis vintage (CI for significance 0.01–0.14), and age (CI for significance 0.008–0.12) were also significant. RWs of phosphate and hs-CRP were not different (CI for significance -0.20–0.04). Contribution of hs-CRP was far more important than that of iCa (31.0 vs 1.0%); (b<sub>1</sub>). In the group of patients with P < 4.35 mg/dL (b<sub>2</sub>), hs-CRP (CI for significance 0.09–0.40) and phosphate (CI for significance 0.02–0.20) were the two significant RWs. hs-CRP contributed far more than phosphate, age and dialysis vintage. Finally, in the group of patients with P > 4.35 mg/dL (b<sub>3</sub>), dialysis vintage (CI for significance 0.05–0.32), hs-CRP (CI for significance 0.01–0.17), and serum phosphate (CI for significance 0.03–0.31) were the significant RWs. There were no differences between RWs of these three variables.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201537.g004>

FGF23 requires sustained control of serum phosphate. Moreover, a further reduction in FGF23 may be achieved by avoiding high serum calcium levels and maintaining low CRP levels.

A progressive reduction of serum phosphate was accompanied by a decrease in iPTH without changes in serum calcium which confirms that PTH is directly regulated by phosphate or through a reduction in skeletal resistance to PTH [40]. Also, hs-CRP levels were reduced in patients with serum phosphate < 4.5 mg/dL, a finding not previously reported in HD patients. Both the reduction in iPTH and CRP levels may have contributed to the decrease in iFGF23 [9,16]. The opposite is true for patients unable to control serum phosphate. In these patients, the increase in PTH and CRP may have contributed to the elevation of iFGF23 and cFGF23. The magnitude of change in both iFGF23 and cFGF23 significantly correlated with the degree of change in serum phosphate concentration. In addition, the change in phosphate correlated with parallel changes in serum CRP levels.

We also examined the variables associated with the high circulating levels of iFGF23 and cFGF23 in HD patients. Our analysis revealed that iFGF23 and cFGF23 molecules correlated with each other. However, the independent variables that correlated with each of the FGF23

molecules were not totally the same, suggesting a differential regulation of each molecule. In the analysis by tertiles of phosphate and in linear regression models, younger age, high serum concentration of phosphate, and CRP were associated with high concentrations of both iFGF23 and cFGF23. However, while iFGF23 was also associated with a higher ionized calcium levels, cFGF23 was associated with the dialysis vintage.

In CKD patients, control of serum phosphate reduced FGF23 levels [23,24]. However, studies demonstrating such an effect on HD patients are limited. To assess the relationship between serum phosphate and FGF23 levels in HD patients, a subset of patients underwent strict control of serum phosphate that resulted in a parallel changes in FGF23. We observed a clear correlation between percent changes in phosphate and percent changes in iFGF23 and cFGF23. Moreover, the contribution of serum phosphate to the elevation of serum levels of iFGF23 was much greater than for cFGF23 (Fig 4). Thus, controlling serum phosphate below the upper normal limit was able to produce a substantial reduction in FGF23, but the levels still remained above normal. Evidently, the next question is once the serum phosphate is controlled, which other variables may further reduce the serum FGF23 levels. These other variables should be additional targets to reduce FGF23. In patients with serum phosphate within the normal range ( $<4.35\text{mg/dL}$ ), cFGF23 was much more influenced by CRP whereas iFGF23 was more dependent on serum ionized calcium than CRP. Therefore, in patients with controlled serum phosphate, high serum calcium works against the reduction in iFGF23. The effect of serum calcium on FGF23 has been shown in animals [10–12,41]. Both serum calcium and CRP are modifiable variables that may affect FGF23 levels in patients with proper control of serum phosphate. PTH stimulates FGF23 production by activating the orphan nuclear receptor Nurr1 [42]. A feedback of FGF23 on PTH production may not be present in advanced hyperparathyroidism due to resistance to the action of FGF23 [8,43–46]. Simple linear correlation analysis showed that a high iPTH level was associated with elevated values of both FGF23 molecules. However, in multivariable analysis, PTH did not contribute significantly to the model predicting FGF23 values. The loss of its statistical power may be due to collinearity between the serum concentration of PTH and both serum P and calcium. Of interest, the reduction in FGF23 associated with cinacalcet may be potentiated by the decrease in serum calcium following the decline in serum phosphate and PTH [21]. This result is not surprising since calcimimetics decrease PTH and serum phosphate, and also reduces serum calcium, all of which have an effect in reducing FGF23 levels [21,47,48].

Regarding inflammation, our data show that high CRP levels correlated with cFGF23 and also but to a lesser extent with iFGF23 levels. In fact, the influence of CRP on cFGF23, as assessed by RWs was nearly 3-fold larger than that of CRP on iFGF23. Furthermore, patients with higher phosphate and higher iFGF23 and cFGF23 showed the highest serum *hs*-CRP levels suggesting that inflammation is likely associated with the increase in both FGF23 molecules. Recent studies have shown that there is a relationship between inflammation and FGF23 [15–17]. Indeed, FGF23 is likely to directly target FGFR4 in hepatocytes to promote the production of inflammatory cytokines in animal models of CKD [49]. Moreover, oral phosphate loading induces an increase in serum  $\text{TNF}\alpha$  and IL-6 [50,51], an effect that was prevented by phosphate binders through the reduction in serum phosphate levels [52]. Thus, it is important to characterize this interrelationship since all of the three components, phosphate, inflammation, and FGF23 appear to be independently associated with mortality and cardiovascular disease in dialysis patients [20]. However, prospective studies designed to analyze the effect of serum phosphate control on inflammation in HD population are lacking. In the present study, we have observed that the reduction in serum phosphate was associated with a concomitant and commensurate reduction in CRP and FGF23. This fact suggests a tight relationship between the change in phosphate, CRP, and FGF23. Analysis of all patients revealed that the

serum concentrations of phosphate and CRP were significantly correlated. However, we do not know if the reduction in serum phosphate decreased CRP directly or it is the reduction in FGF23 that caused the decrease in CRP. Thus, our study supports the notion that control of FGF23 via a reduction in serum phosphate may improve inflammatory status in hemodialysis patients. In fact, those patients with the lowest phosphate, iFGF23 and cFGF23 showed the lowest *hs*-CRP levels. Furthermore, we have observed, like others [53], that dialysis vintage was independently associated with higher cFGF23, which could be explained by long-term exposure to inflammation.

Age and gender have also been associated with elevated FGF23 [54]. However, this association remains controversial [55,56]. The increased FGF23 levels in younger patients may reflect higher protein and phosphate intake. In our study, age showed an inverse correlation with FGF23, which may be attributed to a more modest phosphate intake in older patients and decreased bone remodeling with older age.

Our study has limitations. As compared with other studies in dialysis patients we have included a relatively small number of patients. However, the simultaneous measurement of all blood parameters including intact and c-terminal FGF23 and the prospective evaluation of a subset of patients may have not only strengthened the results but also demonstrated for the first time in HD patients that the reduction in serum phosphate was associated with a reduction in CRP and FGF23. Moreover, all blood parameters were measured in the same sample including both FGF23 molecules, PTH, 25(OH) D, 1,25 (OH)<sub>2</sub> D, *hs*-CRP, ionized calcium and serum phosphate concentration. In the present study, we did not find a significant effect of the type of treatment (P binders, vitamin D, calcimimetics) on FGF23 levels. It is likely that the effect of treatment is obscured by the concomitant changes in parameters that clearly affect FGF23 levels such as serum phosphate and calcium. A different study design would be required to analyze the effect of treatment on FGF23 levels.

In conclusion, different factors may independently influence intact and c-terminal FGF23. Control of serum phosphate is mandatory to reduce both iFGF23 and cFGF23. Reduction of inflammation is another relevant factor that influences the control of FGF23, but mainly the c-FGF23 molecule. It is likely that control of serum phosphate may also reduce inflammatory parameters possibly through a reduction in FGF23. In patients with controlled serum phosphate, a prevention of serum calcium elevation will further reduce iFGF23. Our data support the concept that serum phosphate, FGF23 levels, and inflammation are closely interrelated. These results may have clinical relevance because each of these parameters is associated with increased mortality.

## Supporting information

**S1 Table. Biochemical features of patients stratified by phosphate serum levels below (<4.35 mg/dL) or above the median (>4.35 mg/dL).**  
(DOC)

**S2 Table. Multivariable linear regression analysis according to phosphate serum levels stratified as a binary variable.** Determinants of high FGF23 serum levels in patients with phosphate below 4.35 mg/dL and above 4.35 mg/dL. A) iFGF23, B) cFGF23.  
(DOC)

**S3 Table. Serum phosphate and FGF23 subgroups contrasted in terms of variables evaluated.** Serum phosphate, iFGF23 and cFGF23 were stratified according to their median values and categorized into four different groups.  
(DOC)

**S4 Table. Relative weights (RWs) of all variables clinically associated with an increase in FGF23.** Relative contribution of each variable on serum iFGF23 or cFGF23 in the overall population ( $n = 150$ ) and according to phosphate serum median ( $P < 4.35$  mg/dl or  $P > 4.35$  mg/dl). Some of the variables showed no statistical significance in linear regression analysis, however, its RW is shown.  
(DOC)

**S1 Fig. Dose of prescribed Sevelamer and Lanthanum carbonate in patients with a good or poorer control of serum phosphate ( $< 4.5$  mg/dL vs  $> 4.5$  mg/dL).** Doses changed according to phosphate modifications and patient preference. Dots represents median and whiskers 25th and 75th percentile. The number of patients under each treatment at each time-points are depicted under x-axis. After the 8th week, the number of patients who required both binders simultaneously increased. Between-group differences  $* P < 0.05$ .  
(DOC)

**S2 Fig. Correlations between FGF23, CKD-MBD parameters and ln-CRP.** FGF23 and hs-CRP serum levels are expressed as log-natural transformed. Regression line is represented as a solid line and dashed line represents confidence interval (95% CI). Closed circles represent ln-iFGF23 and opened circles represent ln-cFGF23. Scatter plot of iFGF23 vs cFGF23 (A), iFGF23 and cFGF23 vs serum phosphate (B-C) and iFGF23 and cFGF23 vs hs-CRP levels (D-E).  
(DOC)

**S1 Dataset. Compilation of data from patients included in the longitudinal analysis.**  
(CSV)

**S2 Dataset. Compilation of data from patients included in the cross-sectional analysis.**  
(CSV)

## Acknowledgments

JR Muñoz-Castañeda is a senior researcher supported by the Nicolás Monardes Programme from Consejería de Salud-SAS (Junta de Andalucía).

## Author Contributions

**Conceptualization:** Cristian Rodelo-Haad, Alejandro Martin-Malo.

**Data curation:** Cristian Rodelo-Haad, M. Victoria Pendón-Ruiz de Mier.

**Formal analysis:** Cristian Rodelo-Haad, Maria E. Rodríguez-Ortiz, Alejandro Martin-Malo, M. Luisa Agüera, Juan R. Muñoz-Castañeda, Mariano Rodríguez.

**Funding acquisition:** Alejandro Martin-Malo, Sagrario Soriano, Mariano Rodríguez.

**Investigation:** Cristian Rodelo-Haad, Maria E. Rodríguez-Ortiz, Alejandro Martin-Malo, M. Luisa Agüera, Juan R. Muñoz-Castañeda.

**Methodology:** Cristian Rodelo-Haad, Maria E. Rodríguez-Ortiz, M. Victoria Pendón-Ruiz de Mier, M. Luisa Agüera, Juan R. Muñoz-Castañeda, Francisco Caravaca, Mariano Rodríguez.

**Supervision:** Alejandro Martin-Malo, M. Luisa Agüera, Sagrario Soriano, Francisco Caravaca, Pedro Aljama, Mariano Rodríguez.



**Validation:** Cristian Rodelo-Haad, Maria E. Rodríguez-Ortiz, Alejandro Martin-Malo, M. Victoria Pendon-Ruiz de Mier, M. Luisa Agüera, Juan R. Muñoz-Castañeda, Sagrario Soriano, M. Antonia Alvarez-Lara, Arnold Felsenfeld, Pedro Aljama, Mariano Rodriguez.

**Visualization:** Cristian Rodelo-Haad, Alejandro Martin-Malo, Mariano Rodriguez.

**Writing – original draft:** Cristian Rodelo-Haad, Maria E. Rodríguez-Ortiz, Alejandro Martin-Malo, M. Victoria Pendon-Ruiz de Mier, M. Luisa Agüera, Sagrario Soriano, Francisco Caravaca, M. Antonia Alvarez-Lara, Arnold Felsenfeld, Pedro Aljama, Mariano Rodriguez.

**Writing – review & editing:** Cristian Rodelo-Haad, Alejandro Martin-Malo, M. Victoria Pendon-Ruiz de Mier, M. Luisa Agüera, Juan R. Muñoz-Castañeda, Sagrario Soriano, Francisco Caravaca, M. Antonia Alvarez-Lara, Arnold Felsenfeld, Pedro Aljama, Mariano Rodriguez.

## References

1. Kuro OM. A phosphate-centric paradigm for pathophysiology and therapy of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2013; 3: 420–426. <https://doi.org/10.1038/kisup.2013.88> PMID: 25019024
2. Wolf M. Forging forward with 10 burning questions on FGF23 in kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21: 1427–1435. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009121293> PMID: 20507943
3. Imanishi Y, Inaba M, Nakatsuka K, Nagasue K, Okuno S, Yoshihara A, et al. FGF-23 in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *Kidney Int.* 2004/04/17. 2004; 65: 1943–1946. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00604.x> PMID: 15086938
4. Rodriguez M, Lopez I, Munoz J, Aguilera-Tejero E, Almaden Y. FGF23 and mineral metabolism, implications in CKD-MBD. *Nefrologia.* 2012; 32: 275–278. <https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2012.Mar.11415> PMID: 22592418
5. Evenepoel P, Rodriguez M, Ketteler M. Laboratory abnormalities in CKD-MBD: markers, predictors, or mediators of disease? *Semin Nephrol.* 2014; 34: 151–163. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2014.02.007> PMID: 24780470
6. Wolf M, White KE. Coupling fibroblast growth factor 23 production and cleavage: iron deficiency, rickets, and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014/05/29. 2014; 23: 411–419. <https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000447020.74593.6f> PMID: 24867675
7. Razzaque MS. Phosphate toxicity: new insights into an old problem. *Clin Sci.* 2010/10/21. 2011; 120: 91–97. <https://doi.org/10.1042/CS20100377> PMID: 20958267
8. Canalejo R, Canalejo A, Martinez-Moreno JM, Rodriguez-Ortiz ME, Estepa JC, Mendoza FJ, et al. FGF23 fails to inhibit uremic parathyroid glands. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21: 1125–1135. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009040427> PMID: 20431039
9. Lopez I, Rodriguez-Ortiz ME, Almaden Y, Guerrero F, de Oca AM, Pineda C, et al. Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Kidney Int.* 2011/04/29. 2011; 80: 475–482. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.107> PMID: 21525854
10. Rodriguez-Ortiz ME, Lopez I, Munoz-Castaneda JR, Martinez-Moreno JM, Ramirez AP, Pineda C, et al. Calcium deficiency reduces circulating levels of FGF23. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23: 1190–1197. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011101006> PMID: 22581996
11. Rodriguez-Ortiz ME, Rodriguez M. FGF23 as a calciotropic hormone. *F1000Res.* 2015/01/01. 2015; 4. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7189.1> PMID: 27081473
12. Quinn SJ, Thomsen AR, Pang JL, Kantham L, Brauner-Osborne H, Pollak M, et al. Interactions between calcium and phosphorus in the regulation of the production of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012/12/13. 2013; 304: E310–20. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00460.2012> PMID: 23233539
13. Bielez BO, Hecking M, Plischke M, Cejka D, Kieweg H, Haas M, et al. Correlations and time course of FGF23 and markers of bone metabolism in maintenance hemodialysis patients. *Clin Biochem.* 2014/06/24. 2014; 47: 1316–1319. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.06.009> PMID: 24956265
14. Wetmore JB, Santos PW, Mahnken JD, Krebill R, Menard R, Gutta H, et al. Elevated FGF23 levels are associated with impaired calcium-mediated suppression of PTH in ESRD. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010/10/15. 2011; 96: E57–64. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1277> PMID: 20943782
15. Munoz Mendoza J, Isakova T, Ricardo AC, Xie H, Navaneethan SD, Anderson AH, et al. Fibroblast growth factor 23 and inflammation in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012/05/05. 2012; 7: 1155–1162. <https://doi.org/10.2215/CJN.13281211> PMID: 22554719

16. David V, Martin A, Isakova T, Spaulding C, Qi L, Ramirez V, et al. Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production. *Kidney Int.* 2015/11/05. 2016; 89: 135–146. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.290> PMID: 26535997
17. Rossaint J, Unruh M, Zarbock A. Fibroblast growth factor 23 actions in inflammation: a key factor in CKD outcomes. *Nephrol Dial Transpl.* 2016/09/24. 2017; 32: 1448–1453. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw331> PMID: 27659127
18. Witasp A, Van Craenenbroeck AH, Shiels PG, Ekstrom TJ, Stenvinkel P, Nordfors L. Current epigenetic aspects the clinical kidney researcher should embrace. *Clin Sci.* 2017/07/02. 2017; 131: 1649–1667. <https://doi.org/10.1042/CS20160596> PMID: 28667065
19. Gutierrez OM, Januzzi JL, Isakova T, Laliberte K, Smith K, Collierone G, et al. Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation.* 2009/05/06. 2009; 119: 2545–2552. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.844506> PMID: 19414634
20. Gutierrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, et al. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.* 2008/08/09. 2008; 359: 584–592. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706130> PMID: 18687639
21. Moe SM, Chertow GM, Parfrey PS, Kubo Y, Block GA, Correa-Rotter R, et al. Cinacalcet, Fibroblast Growth Factor-23, and Cardiovascular Disease in Hemodialysis: The Evaluation of Cinacalcet HCl Therapy to Lower Cardiovascular Events (EVOLVE) Trial. *Circulation.* 2015/06/11. 2015; 132: 27–39. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013876> PMID: 26059012
22. Leifheit-Nestler M, Grosse Siemer R, Flasbart K, Richter B, Kirchhoff F, Ziegler WH, et al. Induction of cardiac FGF23/FGFR4 expression is associated with left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transpl.* 2015/12/19. 2016; 31: 1088–1099. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw421> PMID: 26681731
23. Isakova T, Barchi-Chung A, Enfield G, Smith K, Vargas G, Houston J, et al. Effects of dietary phosphate restriction and phosphate binders on FGF23 levels in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2013/03/09. 2013; 8: 1009–1018. <https://doi.org/10.2215/CJN.09250912> PMID: 23471131
24. Soriano S, Ojeda R, Rodriguez M, Almaden Y, Rodriguez M, Martin-Malo A, et al. The effect of phosphate binders, calcium and lanthanum carbonate on FGF23 levels in chronic kidney disease patients. *Clin Nephrol.* 2013/02/09. 2013; 80: 17–22. <https://doi.org/10.5414/CN107764> PMID: 23391319
25. Oliveira RB, Cancela AL, Gracioli FG, Dos Reis LM, Draibe SA, Cuppari L, et al. Early control of PTH and FGF23 in normophosphatemic CKD patients: a new target in CKD-MBD therapy? *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009/12/08. 2010; 5: 286–291. <https://doi.org/10.2215/CJN.05420709> PMID: 19965540
26. Shigematsu T, Negi S, COLC Research Group. Combined therapy with lanthanum carbonate and calcium carbonate for hyperphosphatemia decreases serum FGF-23 level independently of calcium and PTH (COLC Study). *Nephrol Dial Transplant.* 2012; 27: 1050–4. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr388> PMID: 21771755
27. Lin H-H, Liou H-H, Wu M-S, Lin C-Y, Huang C-C. Long-term sevelamer treatment lowers serum fibroblast growth factor 23 accompanied with increasing serum Klotho levels in chronic haemodialysis patients. *Nephrology (Carlton).* 2014; 19: 672–8. <https://doi.org/10.1111/nep.12319> PMID: 25113414
28. Block GA, Rosenbaum DP, Yan A, Greasley PJ, Chertow GM, Wolf M. The effects of tenapanor on serum fibroblast growth factor 23 in patients receiving hemodialysis with hyperphosphatemia. *Nephrol Dial Transplant.* 2018; <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy061> PMID: 29617976
29. Van Buren PN, Lewis JB, Dwyer JP, Greene T, Middleton J, Sika M, et al. The Phosphate Binder Ferric Citrate and Mineral Metabolism and Inflammatory Markers in Maintenance Dialysis Patients: Results From Prespecified Analyses of a Randomized Clinical Trial. *Am J Kidney Dis.* 2015; 66: 479–88. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2015.03.013> PMID: 25958079
30. Honda H, Michihata T, Shishido K, Takahashi K, Takahashi G, Hosaka N, et al. High fibroblast growth factor 23 levels are associated with decreased ferritin levels and increased intravenous iron doses in hemodialysis patients. *PLoS One.* 2017/05/06. 2017; 12: e0176984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176984> PMID: 28475601
31. Brandenburg VM, Schlieper G, Heussen N, Holzmann S, Busch B, Evenepoel P, et al. Serological cardiovascular and mortality risk predictors in dialysis patients receiving sevelamer: a prospective study. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 25: 2672–9. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq053> PMID: 20172849
32. Sprague SM, Wetmore JB, Gurevich K, Da Roza G, Buerkert J, Reiner M, et al. Effect of Cinacalcet and Vitamin D Analogs on Fibroblast Growth Factor-23 during the Treatment of Secondary Hyperparathyroidism. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015; 10: 1021–1030. <https://doi.org/10.2215/CJN.03270314> PMID: 25873267
33. Cancela AL, Oliveira RB, Gracioli FG, dos Reis LM, Barreto F, Barreto D V, et al. Fibroblast growth factor 23 in hemodialysis patients: effects of phosphate binder, calcitriol and calcium concentration in the



- dialysate. *Nephron Clin Pr.* 2010/08/07. 2011; 117: c74–82. <https://doi.org/10.1159/000319650> PMID: [20689328](#)
34. Torregrosa J V, Bover J, Cannata Andia J, Lorenzo V, de Francisco AL, Martinez I, et al. Spanish Society of Nephrology recommendations for controlling mineral and bone disorder in chronic kidney disease patients (S.E.N.-M.B.D.). *Nefrologia.* 2011; 31 Suppl 1: 3–32. <https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2011.Jan.10816> PMID: [21468161](#)
35. Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, Fukagawa M, Herzog CA, McCann L, et al. Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: whats changed and why it matters. *Kidney Int. Elsevier;* 2017; 92: 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.04.006> PMID: [28646995](#)
36. Belsley DA Welsch RE. KE. Regression diagnostics: Identifying influential data and sources of collinearity. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken EE. UU.: John Wiley & Sons, Inc. NJ, editor. Hoboken, NJ, EE. UU.: John Wiley & Sons, Inc. 1980.
37. Lorenzo-Seva U, Ferrando PJ. FIRE: an SPSS program for variable selection in multiple linear regression analysis via the relative importance of predictors. *Behav Res Methods.* 2011/02/03. 2011; 43: 1–7. <https://doi.org/10.3758/s13428-010-0043-y> PMID: [21287104](#)
38. Johnson JW. A Heuristic Method for Estimating the Relative Weight of Predictor Variables in Multiple Regression. *Multivar Behav Res.* 2000/01/01. 2000; 35: 1–19. [https://doi.org/10.1207/S15327906MBR3501\\_1](https://doi.org/10.1207/S15327906MBR3501_1) PMID: [26777229](#)
39. Tonidandel S, Lebreton JM, Johnson JW. Determining the statistical significance of relative weights. *Psychol Methods.* 2009; 14: 387–99. <https://doi.org/10.1037/a0017735> PMID: [19968399](#)
40. Almaden Y, Canalejo A, Hernandez A, Ballesteros E, Garcia-Navarro S, Torres A, et al. Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro. *J Bone Min Res.* 1996/07/01. 1996; 11: 970–976. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650110714> PMID: [8797118](#)
41. David V, Dai B, Martin A, Huang J, Han X, Quarles LD. Calcium regulates FGF-23 expression in bone. *Endocrinology.* 2013/10/22. 2013; 154: 4469–4482. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1627> PMID: [24140714](#)
42. Meir T, Durlacher K, Pan Z, Amir G, Richards WG, Silver J, et al. Parathyroid hormone activates the orphan nuclear receptor Nurr1 to induce FGF23 transcription. *Kidney Int.* 2014; 86: 1106–1115. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.215> PMID: [24940803](#)
43. Galitzer H, Ben-Dov IZ, Silver J, Naveh-Many T. Parathyroid cell resistance to fibroblast growth factor 23 in secondary hyperparathyroidism of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2009/12/18. 2010; 77: 211–218. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.464> PMID: [20016468](#)
44. Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many T. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop. *Am J Physiol Ren Physiol.* 2010; 299: F882–9. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00360.2010> PMID: [20685823](#)
45. Kovesdy CP, Quarles LD. Fibroblast growth factor-23: what we know, what we don't know, and what we need to know. *Nephrol Dial Transplant.* 2013; 28: 2228–36. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft065> PMID: [23625971](#)
46. Silver J, Rodriguez M, Slatopolsky E. FGF23 and PTH—double agents at the heart of CKD. *Nephrol Dial Transpl.* 2012/03/27. 2012; 27: 1715–1720. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs050> PMID: [22447519](#)
47. Koizumi M, Komaba H, Nakanishi S, Fujimori A, Fukagawa M. Cinacalcet treatment and serum FGF23 levels in haemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transpl.* 2012; 27: 784–790. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr384> PMID: [21730210](#)
48. Chertow GM, Block GA, Correa-Rotter R, Drueke TB, Floege J, Goodman WG, et al. Effect of cinacalcet on cardiovascular disease in patients undergoing dialysis. *N Engl J Med.* 2012/11/06. 2012; 367: 2482–2494. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1205624> PMID: [23121374](#)
49. Singh S, Grabner A, Yanucil C, Schramm K, Czaya B, Krick S, et al. Fibroblast growth factor 23 directly targets hepatocytes to promote inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2016/07/28. 2016; 90: 985–996. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.05.019> PMID: [27457912](#)
50. Yamada S, Tokumoto M, Tatsumoto N, Taniguchi M, Noguchi H, Nakano T, et al. Phosphate overload directly induces systemic inflammation and malnutrition as well as vascular calcification in uremia. *Am J Physiol Ren Physiol.* 2014/05/09. 2014; 306: F1418–28. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00633.2013> PMID: [24808541](#)
51. Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C, Muros M, Herrera H, Garcia J. Mineral metabolism and inflammation in chronic kidney disease patients: a cross-sectional study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009/10/08. 2009; 4: 1646–1654. <https://doi.org/10.2215/CJN.02420409> PMID: [19808245](#)

52. Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C, Muros de Fuentes M, Donate-Correa J, Cazana-Perez V, Garcia-Perez J. Effect of phosphate binders on serum inflammatory profile, soluble CD14, and endotoxin levels in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011/07/26. 2011; 6: 2272–2279. <https://doi.org/10.2215/CJN.01650211> PMID: [21784820](#)
53. Isakova T, Xie H, Barchi-Chung A, Vargas G, Sowden N, Houston J, et al. Fibroblast growth factor 23 in patients undergoing peritoneal dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011/09/10. 2011; 6: 2688–2695. <https://doi.org/10.2215/CJN.04290511> PMID: [21903990](#)
54. di Giuseppe R, Kuhn T, Hirche F, Buijsse B, Dierkes J, Fritsche A, et al. Potential Predictors of Plasma Fibroblast Growth Factor 23 Concentrations: Cross-Sectional Analysis in the EPIC-Germany Study. *PLoS One*. 2015; 10: e0133580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133580> PMID: [26193703](#)
55. Ohta H, Sakuma M, Suzuki A, Morimoto Y, Ishikawa M, Umeda M, et al. Effects of gender and body weight on fibroblast growth factor 23 responsiveness to estimated dietary phosphorus. *J Med Invest*. 2016/04/05. 2016; 63: 58–62. <https://doi.org/10.2152/jmi.63.58> PMID: [27040054](#)
56. Olauson H, Qureshi AR, Miyamoto T, Barany P, Heimbürger O, Lindholm B, et al. Relation between serum fibroblast growth factor-23 level and mortality in incident dialysis patients: are gender and cardiovascular disease confounding the relationship? *Nephrol Dial Transpl*. 2010/04/07. 2010; 25: 3033–3038. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq191> PMID: [20368304](#)